FLAVODOXIN AUS CLOSTRIDIUM KLUYVERI.

Anreicherung, Charakterisierung und biologische Aktivität.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Tasso Schwan
aus Pilsen

Göttingen 1975

FLAVODOXIN AUS CLOSTRIDIUM KLUYVERI.

Anreicherung, Charakterisierung und biologische Aktivität.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Tasso Schwan
aus Pilsen

Göttingen 1975

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie
der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk
Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel
Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1975

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
3.	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	46
3.1.	Gärungsbilanzen von Normal-Eisen- und Eisenmangel-Kulturen	46
3.1.1.	Abhängigkeit des Gärungsverlaufs von der Eisenkonzentration	46
3.1.2.	Einfluß von Molybdän auf den Stoffwechsel von Clostridium kluyveri	52
3.1.3.	Massenkultur und Fermenteranzucht	54
3.1.4.	Abhängigkeit des Flavingehaltes von der Eisenkonzentration	55
3.2.	Anreicherung von Flavodoxin aus Clostridium kluyveri	59
3.2.1.	Methoden zur Flavodoxinbestimmung	59
3.2.2.	Regulativer Einfluß der Eisenkonzentration auf die Flavodoxinsynthese	62
3.2.3.	Anreicherung von Flavodoxin	63
3.2.4.	Analytische Disk-Elektrophorese	76
3.3.	Charakterisierung des Flavodoxins	78
3.3.1.	Identifizierung der prosthetischen Gruppe	78
3.3.2.	Ermittlung der Extinktionskoeffizienten	79
3.3.3.	Thermische Dissoziation des FMN vom Apoflavodoxin	82
3.3.4.	Bestimmung des Molekulargewichtes	84
3.3.5.	Bestimmung des molaren Verhältnisses von FMN zum Apoprotein	89
3.3.6.	Ermittlung des Eisengehaltes und der freien Sulfhydryl-Gruppen im Flavodoxinmolekül	90
3.3.7.	Spektroskopische Charakterisierung des Flavodoxins	90
3.3.7.1.	Zirkular-Dichroismus-Spektren	93

Seite

3.3.7.2. Fluoreszenzmessungen 95
3.3.7.3. Radikal-(Semichinon)-Form des Flavodoxins 96
3.3.7.4. Anaerobe Photoreduktion 98
3.3.8. Anaerobe Titration von Flavodoxin 103
3.3.9. Aminosäurezusammensetzung des Flavodoxins 105
3.4. Biologische Aktivität des Flavodoxins 108
3.4.1. Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase 108
3.4.2. Hydrogenase 110
3.4.3. NAD(P)-Ferredoxin-Reduktasen 116
3.4.4. Pyruvat-Synthase 119
3.5. Orangefarbenes Flavoprotein 121
3.5.1. Identifizierung der prosthetischen Gruppe 124
3.5.2. Fluoreszenzmessungen 127
3.5.3. Differenzspektren des Semichinon-Anions 128
3.5.4. Anaerobe Photoreduktion in Gegenwart von EDTA 130
3.5.5. Biologische Aktivität 131

4. DISKUSSION 133

5. ZUSAMMENFASSUNG 153

6. LITERATURVERZEICHNIS 156

1. EINLEITUNG

Im Energiestoffwechsel von Clostridien können Protonen als terminale Elektronenakzeptoren fungieren. Das Reduktionsprodukt wird in Form von molekularem Wasserstoff durch die katalytische Funktion des Ferredoxins und der Hydrogenase freigesetzt.

Clostridium kluyveri gewinnt Energie durch die Vergärung von Äthanol und Acetat unter Bildung von Wasserstoff, Butyrat und Caproat (BARKER und TAHA, 1942). Als energiereiches Zwischenprodukt wird Acetyl-CoA gebildet, das in einer Kondensationsreaktion weiter zu Buttersäure reduziert wird oder nach Umwandlung in Acetylphosphat der ATP-Gewinnung dient. Wasserstoff- und ATP-Bildung sind streng miteinander gekoppelt; nur wenn H_2 freigesetzt wird, steht Acetyl-CoA für die Energiegewinnung zur Verfügung.

Neben Äthanol und Acetat als Kohlenstoffquellen benötigt C. kluyveri Kohlendioxid (TOMLINSON und BARKER, 1954). Dieses dient der reduktiven Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Pyruvat in einer ferredoxinabhängigen Reaktion. Pyruvat wiederum ist die Ausgangsverbindung für die Biosynthese der Zellbausteine (Abb. 1).

So wird deutlich, daß Ferredoxin in C. kluyveri eine bedeutende Rolle spielt und ein wesentliches Element des Energie- und Biosynthese-Stoffwechsels ist (FREDRICKS und STADTMAN, 1965; ANDREW und MORRIS, 1965; THAUER et al., 1969, 1970, 1971; GOTTSCHALK und CHOWDHURY, 1969; JUNGERMANN et al., 1968, 1969, 1971).

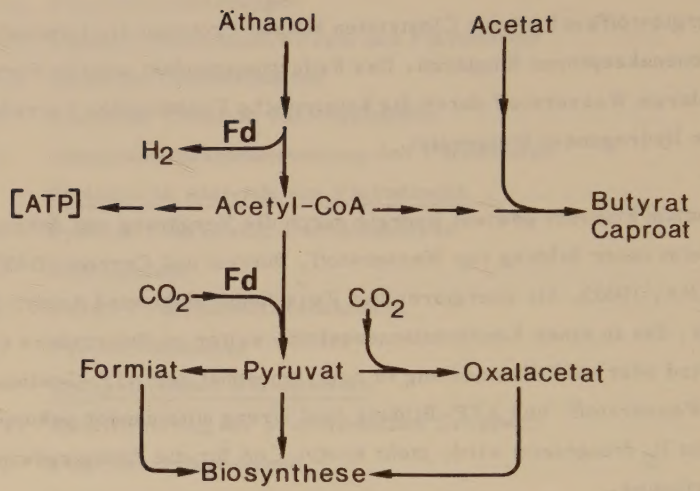


Abb. 1 Schema der ferredoxinabhängigen Reaktionen der Äthanol-Acetat-Gärung von C. kluyveri

(Fd = Ferredoxin)

Die elementaren Funktionen der non-heme-iron Proteine Ferredoxin und Hydrogenase erfordern einen hohen Eisengehalt der Nährlösung; Eisenmangelbedingungen rufen Störungen hervor, die bis zu einem gewissen Grade durch Variation der Gärungsendprodukte oder Neusynthese funktionsanaloger Proteine aufgefangen werden können. So produziert C. welchii unter Eisenmangelbedingungen das sonst nicht gebildete Lactat und nur geringe Mengen Butyrat und Wasserstoff (PAPPENHEIMER und SHASKAN, 1944). C. pasteurianum synthetisiert anstelle von Ferredoxin das eisenfreie Flavodoxin als Elektronenüberträger (KNIGHT, D'EUSTACHIO, HARDY, 1966). Das wenige noch zur Verfügung stehende Eisen wird in die-

sem Falle für die Hydrogenase-Bildung verwendet.

Unter Eisenmangel-Bedingungen wird von einigen Bakterien das eisenfreie Elektronentransport-Protein Flavodoxin gebildet (KNIGHT und HARDY, 1966; MAYHEW und MASSEY, 1969). Flavodoxin kann Ferredoxin in seinen Reaktionen ersetzen und wurde bei anaeroben und aeroben Organismen isoliert.

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologischen Reaktionen von C. kluyveri, dessen Stoffwechsel insgesamt extrem ferredoxinabhängig ist, unter Eisenmangel-Bedingungen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß C. kluyveri in der Lage ist, unter diesen Bedingungen ebenfalls Flavodoxin zu synthetisieren. Die Anreicherung, Charakterisierung und Kristallisierung dieses Elektronenüberträgers wird beschrieben und die biologische Aktivität des Flavodoxins der des Ferredoxins gegenübergestellt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Organismen

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit dem Originalstamm von Clostridium kluyveri (BARKER, 1937) durchgeführt. Clostridium pasteurianum stammte von der American Type Culture Collection ATCC 6013.

2.2. Nährlösungen und Zellanzucht

2.2.1. Eisenmangelmedium für C. kluyveri (STADTMAN und BURTON, 1955, modifiziert)

95 %iges	Äthanol	15 ml
5 M	Kaliumacetat, pH 7,0	20 ml
1 M	KPO_4-Puffer, pH 7,0	3,5 ml
1,8 M	NH_4Cl	2,5 ml
0,76 M	$MgCl_2$	1,0 ml
90 mM	$CaCl_2$	1,0 ml
4 mM	$MnSO_4$	2,0 ml
3 mg%	Biotin	0,3 ml
50 mg%	p-Aminobenzoesäure	0,4 ml
1,5 M	$KHCO_3$	20 ml
	Na-Thioglycolat	500 mg
	Na-Dithionit	30 mg
	H_2O dest.	ad 1 000 ml
	pH 7,4	
	Inkubationstemperatur	35,5° C

Zur Anzucht von Normal-Kulturen wurde 1 ml einer 40 mM $FeSO_4$-Lösung pro 1 000 ml Nährlösung zugefügt.

2.2.2. Anzucht

Die Nährlösungen wurden stets ohne Äthanol autoklaviert, $KHCO_3$ wurde mit einem Seitz-Filter steril filtriert. Bei der eisenhaltigen Normal-Nährlösung war ein getrenntes Autoklavieren des KPO_4-Puffers erforderlich. In Kulturen bis zu 1 l wurden die beiden Vitamine mit der Nährlösung zusammen, in größeren Kulturen wegen der längeren Autoklavierzeit getrennt sterilisiert. Nach Zugabe aller erforderlichen Nährlösungskomponenten wurde das Medium in einer sterilen CEAG-Laminar-flow Werkbank (Schirp Reinraumtechnik, Bork, Westf.) 10 min mit einem N_2/CO_2 (80 : 20) Gemisch äquilibriert. Anschließend wurde Na-Thioglycolat zugesetzt und das Medium unter Begasen beimpft. Unmittelbar vor Verschließen des Gefäßes erfolgte die Zugabe des Na-Dithionit. Alle verwendeten Kulturgefäße wurden mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossen und mit Bubble-Röhrchen versehen. Die Flüssigkeit in den Röhrchen verhinderte eine O_2-Diffusion in das Kulturgefäß, gestattete aber gleichzeitig das für das Wachstum wesentliche kontinuierliche Entweichen des gebildeten Wasserstoffs.

2.2.3. Depot-Kulturen

Eisenmangel-Kulturen wurden ständig in 1 l-Flaschen nach 2 - 3 tägiger Inkubation überimpft und so stets bei aktivem Wachstum gehalten.

2.2.4. Massenanzucht

2.2.4.1. Glasflaschen

Zur Massenanzucht wurden 20 l-Glasflaschen (Carboys) verwendet. Um das Entweichen des gebildeten Wasserstoffs zu beschleunigen, wurden die Kulturen während des logarithmischen Wachstums mit Magnetstäben gerührt. Im allgemeinen wurden die Eisenmangel-Nährlösungen 25 %ig, die übrigen 10 %ig beimpft.

2.2.4.2. Fermenter

Für größere Anzuchten wurden die 185 l- und 365 l-Fermenter der AG für Biologische Verfahrenstechnik (Basel) herangezogen. Die Nährlösungskomponenten für 110 l bzw. 250 l wurden in fester Form in die Fermenter gegeben und hitzesterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde Äthanol und steril filtrierte $KHCO_3$-Lösung eingefüllt und der Ansatz über ein Begasungssystem 15 min mit N_2/CO_2 äquilibriert. Mit Beginn des logarithmischen Wachstums wurde mittels eines Kontaktors (Umwälzsystem, Rührgeschwindigkeit 300 upm) gerührt.

Da beide Fermenter ein verschließbares Rohrleitungssystem verband, konnte zur Anzucht ein effizientes "Ping-Pong"-Verfahren entwickelt werden. Nach Wachstum im 185 l-Fermenter wurde ein definiertes Volumen Zellsuspension als Impfmaterial in den mit Nährlösung gefüllten 365 l-Fermenter überführt und das restliche Zellmaterial geerntet. Der 185 l-Fermenter wurde mit frischer Nährlösung gefüllt, sterilisiert und mit geeignetem Zellmaterial des 365 l-Fermenters beimpft. Nach der Ernte und Beschicken des 365 l-Fermenters wurde wiederum vom 185 l-Fermenter beimpft. Dieses "Ping-Pong"-Verfahren erlaubte von der technischen Seite eine nahezu unbegrenzte Massenanzucht und bot gegenüber der beschwerlichen Anzucht in 20 l-Carboys erhebliche Vorteile.

2.2.5. Medium für C. pasteurianum

	Fructose	20 g
	Pepton	2 g
	Trypton	2 g
	Hefeextrakt	6 g
0,2 M	$MgSO_4$	0,5 ml
0,2 M	$FeSO_4$	0,2 ml
0,1 M	$MnCl_2$	0,1 ml

1	M	$CaCl_2$	0,1 ml
0,1	M	$CoCl_2$	0,1 ml
0,1	M	Na_2MoO_4	0,1 ml
1	M	K_2HPO_4	32,4 ml
1	M	KH_2PO_4	7,6 ml
		H_2O dest.	ad 1 000 ml
		pH 7,4	
		Inkubationstemperatur 36° C	

Phosphatpuffer wurde getrennt autoklaviert, Fructose bei allen Ansätzen steril filtriert. Kulturtechnik und Massenanzucht waren analog zur C. kluyveri Anzucht.

2.3. Wachstumskontrolle und Ernte

Das Wachstum der Massenkulturen wurde anhand von Trübungsmessungen im Zeiss PL 4 Photometer verfolgt (Glasküvetten d = 1 cm, λ = 546 nm).

Massenkulturen (80 - 120 l) in 20 l-Carboys wurden unter Kühlung mittels einer Durchlaufzentrifuge (CEPA, Firma C. Padberg, Lahr/Baden) bei 36 000 upm geerntet.

Fermenterkulturen (80 - 320 l) wurden zunächst durch einen Separator konzentriert (Westfalia Separator Typ SAOOH 205, Firma Westfalia Separator AG, Oelde/Westf.). Das Konzentrat wurde in einer Christ Zeta 20 Zentrifuge (Firma Heraeus-Christ GmbH, Osterode/Harz) bei 8 000 xg und 4° C 20 min lang sedimentiert.

Ausbeuten:	C. pasteurianum	7 g Naßgewicht/l NL
	C. kluyveri (Fe normal)	1 g Naßgewicht/l NL
	C. kluyveri (Fe-Mangel)	400 mg Naßgewicht/l NL

Das Zellmaterial zur Enzymbestimmung wurde bei -20° C eingefroren. Die Zellpaste zur Flavodoxin- und Ferredoxin-Anreicherung wurde in einer dünnen Schicht (0,5 cm) eingefroren und anschließend in einem Gefriertrockner lyophilisiert (DESAGA Modell Freeze-Mobil, Firma Desaga, Heidelberg). Nach Ermittlung des Trockengewichtes wurden die Lyophilisate unter einer H_2-Atmosphäre bei -20° C aufbewahrt.

2.4. Herstellung zellfreier Extrakte

2.4.1. Autolyse (bei Anreicherung)

a Gramm Trockenzellen wurden in einer Büchnerflasche mit 10 x a ml bidest. Wasser versetzt und im Dunkeln (Lichtempfindlichkeit der Flavine) 1 Stunde bei Zimmertemperatur magnetisch gerührt. Anschließend wurden die Zellrückstände durch 30minütige Zentrifugation (17 000 xg, 4° C) sedimentiert, der Überstand als Extrakt I bezeichnet und abgedunkelt bei 4° C aufbewahrt. Das Präzipitat wurde mit $\frac{10 \times a \text{ ml}}{2}$ bidest. Wasser aufgenommen und der Vorgang der Autolyse wiederholt. Die vereinigten Extrakte I und II ergaben den Rohextrakt.

2.4.2. French Presse (bei Enzymtest)

Um einen möglichst schonenden Zellaufschluß zu erlangen, wurde diese Form der Extraktherstellung gewählt. Gefrorenes Zellmaterial wurde in einem Erlenmeyerkolben bei Anwesenheit eines reduzierenden Agens (Glutathion oder Mercaptoäthanol) in einem definierten Volumen Puffer aufgetaut. Nach Zugabe von 4 mg Lysozym und 1 mg DNase je 10 ml Zellsuspension wurde unter H_2-Strom 1 Stunde bei Zimmertemperatur magnetisch gerührt. Dieser Extrakt wurde in eine auf 4° C vorgekühlte French Presse gefüllt und mit einem Druck von 8 t/cm^2 durch die feine Öffnung gepreßt. Die Suspension wurde möglichst rasch mit H_2 überschichtet und bei 4° C 30 min bei 17 000 upm zentrifugiert.

2.5. Proteinbestimmungen

2.5.1. Proteinbestimmung an ganzen Zellen (LA RIVIERE, 1958, modifiziert nach SCHMIDT et al., 1963)

Eine definierte Menge Bakteriensuspension wurde mit dest. Wasser auf 5,0 ml gebracht, mit 0,5 ml 16 %iger NaOH versetzt und für 10 min in einem siedenden Wasserbad inkubiert und sofort wieder abgekühlt. Nach Zugabe von 2,0 ml einer Lösung, die aus 5 g K-Na-Tartrat, 1 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 2,5 g KJ und 4 g NaOH in 400 ml H_2O dest. bestand, wurde die Mischung 30 min bei 37° C gehalten und anschließend 20 min bei 4 000 upm zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde mit dem Zeiss PL 4 Photometer bei 546 nm gegen einen Reagenzien-Leerwert in d = 1 cm Küvetten bestimmt.

2.5.2. Proteinbestimmung zellfreier Extrakte (BEISENHERZ et al., 1953)

0,1 ml zellfreier Extrakt wurde mit 0,75 ml dest. Wasser verdünnt. Es wurden 0,15 ml 3 M TCA zugegeben, 5 min bei 4 000 upm zentrifugiert und der Überstand sorgfältig dekantiert. Das Pellet wurde mit 4,9 ml dest. Wasser aufgenommen und mit 5 ml Biuretreagenz (9 g K-Na-Tartrat, 3 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 5 g KJ in 1 000 ml Carbonat-freier 0,2 N NaOH) versetzt. Nach 30 min Stehen bei Zimmertemperatur und gelegentlichem Aufschütteln erfolgte die Messung der Extinktion bei 546 nm im Zeiss PL 4 Photometer gegen einen Reagenzienleerwert in d = 2 cm Küvetten.

2.5.3. Proteinbestimmung zellfreier Extrakte (LOWRY et al., 1951, modifiziert nach SCHACTERLE und POLLACK, 1973)

Reagenz 1: Zu einer 0,5 N NaOH-Lösung wurden 10 % Na_2CO_3, 0,1 % K-Tartrat und 0,05 % $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ gegeben. Diese Lösung war bei Zimmertemperatur (24° C) etwa 30 Tage stabil.

Reagenz II: Das Folin-Ciocalteus Phenol Reagenz (2 N Lösung, Merck, Darmstadt) wurde 1 : 1 verdünnt. Von diesem wurde durch Verdünnen von 0,5 ml der 1 N Lösung mit 4 ml dest. Wasser eine Gebrauchslösung hergestellt.

Zur Proteinprobe wurden 2 ml dest. Wasser und 0,5 ml 20 %ige TCA gegeben. Nach 10 min wurde bei 4 000 upm abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Wasser aufgenommen. 1 ml des alkalischen Kupfer-Reagenz wurde mit 1 ml Probe in einem Reagenzglas gemischt und 10 min stehen gelassen. Dann wurden 4 ml der Phenollösung II zugegeben und das Reagenzglas in einem Wasserbad 5 min bei 55° C inkubiert. Anschließend wurde das Probenglas rasch unter fließendem Wasser abgekühlt (1 min) und die Extinktion bei 650 nm gegen einen Reagenzienleerwert in d = 2 cm Küvetten ermittelt.

Für alle drei Proteinbestimmungen wurden Eichkurven mit Rinderserumalbumin-Lösung (Fraktion V, Sigma, St. Louis, USA) als Standard aufgenommen.

2.5.4. Proteinbestimmung von reinen Flavodoxinlösungen

Eine Flavodoxinlösung wurde zur Entfernung des K-Phosphates gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Von dem gelb gefärbten Lyophilisat wurden sorgfältig verschiedene Proteinmengen als Trokkengewicht eingewogen und in je 1 ml dest. Wasser suspendiert. Die Extinktionen dieser Proben wurden im Zeiss PL 4 Photometer gegen Wasser in d = 1 cm Küvetten bei 445 nm (Absorptionsmaximum von Flavodoxin) bestimmt und gegen die eingewogenen Mengen Protein-Trockengewicht aufgetragen. In der so ermittelten Proteineichkurve konnte nach bekannter $Extinktion_{(445\ nm)}$ einer Probe der Proteingehalt direkt abgelesen werden. 1 mg Flavodoxin (Trockengewicht)/ml hat eine Extinktion bei 445 nm (gegen Wasser) von 0,506.

2.6. Trockengewicht

Das Trockengewicht wurde mit Hilfe gewichtskonstanter Membranfilter (BA 83/1 Selectron-Filter, Firma Schleicher und Schüll) bestimmt. Die Filter wurden 2 Stunden bei 105° C getrocknet, im Eksikkator abgekühlt und ausgewogen. 50 ml Zellsuspension wurden auf den Filtern abgesaugt, zweimal mit 5 ml dest. Wasser gewaschen und 6 Stunden bei 105° C getrocknet (STOUTHAMER, 1969). Nach Abkühlen im Eksikkator ließ sich aus der Gewichtsdifferenz das jeweilige Trockengewicht ermitteln.

2.7. Entfernung von Eisen aus der Nährlösung

In der Nährlösung als Kontamination der Chemikalien vorhandenes Eisen konnte mit Hilfe eines chelatbildenden Harzes entfernt werden.

Bezeichnung: Dowex Chelating Resin A-1 (DCR A-1, Serva, Heidelberg)
Korngröße: 50 - 100 mesh
Gegenion: Na

Die Struktur des Harzes besteht aus einem Styren-Divinylbenzol-Copolymer, in dem Iminodiacetyl-Gruppen gebunden sind. Durch gewisse Anordnungen zweier Carboxylgruppen und einem tert. Stickstoff erhält der Austauscher seine chelatbildenden Eigenschaften mit folgender Selektivitäts-Sequenz:

$$Pd^{++} > Cu^{++} \gg Fe^{++} > Ni^{++} > Pb^{++} > Mn^{++} \gg Ca^{++} \approx Mg^{++} \gg Na^{+}$$

500 ml der zu enteisenden Lösung wurden in einem Becherglas mit 25 g gewaschenem DCR A-1 versetzt und mit einem Magnetrührer kräftig gerührt. Die Kontaktzeit betrug 1 Stunde. Anschließend wurde die Lösung zum Absetzen des Harzes stehen gelassen, dann über einer Fritte abgesaugt und der pH kontrolliert.

2.8. Bestimmung von Eisen

2.8.1. Biochemica-Test-Combination "Eisen" (Boehringer, Mannheim)

In Zentrifugengläser wurden 1 ml 1 N HCl und 2 ml des Überstandes einer zentrifugierten Bakteriensuspension pipettiert. Nach Mischen und Stehenlassen bei Raumtemperatur wurden 1 ml 1,23 M TCA zugegeben und gemischt. Anschließend wurde 10 min bei 4 000 upm zentrifugiert. 2 ml des Überstandes wurden mit 1 ml einer Lösung aus: 0,56 mM Bathophenantrolin-disulfonat, 4 M Acetatpuffer, pH 4,6, 0,1 M $Na_2S_2O_5$ und 16 mM p-Methylaminophenol gemischt und die Extinktion im Zeiss Photometer PL 4 bei 546 nm in d = 1 cm Küvetten gegen einen Leerwert gemessen. Die Berechnung erfolgte anhand eines mitgeführten Standards:

$$c = \frac{E_{Probe}}{E_{Standard}} \quad (\mu g\ Fe/ml)$$

2.8.2. Methode von CAMERON (1965), modifiziert nach CAMPBELL (1973)

Je 100 µl in 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,9, aufgenommene Proben, Kontrolle (nur Puffer) und Standard wurden mit 200 µl 70 %iger Perchlorsäure versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl 1,44 M Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung und weitere 30 min Inkubation bei Zimmertemperatur. 100 µl einer 9,32 mM Bathophenantrolindisulfonsäure-Lösung, 500 µl 99,5 %iges Pyridin und 1 ml dest. Wasser wurden hinzugefügt und die Extinktion bei 536 nm gegen eine Kontrolle gemessen (Zeiss PL 4 Photometer, d = 1 cm Küvetten). Eine Eichkurve wurde mit einer Eisenstandard-Lösung (Riedel-de Haen) aufgenommen.

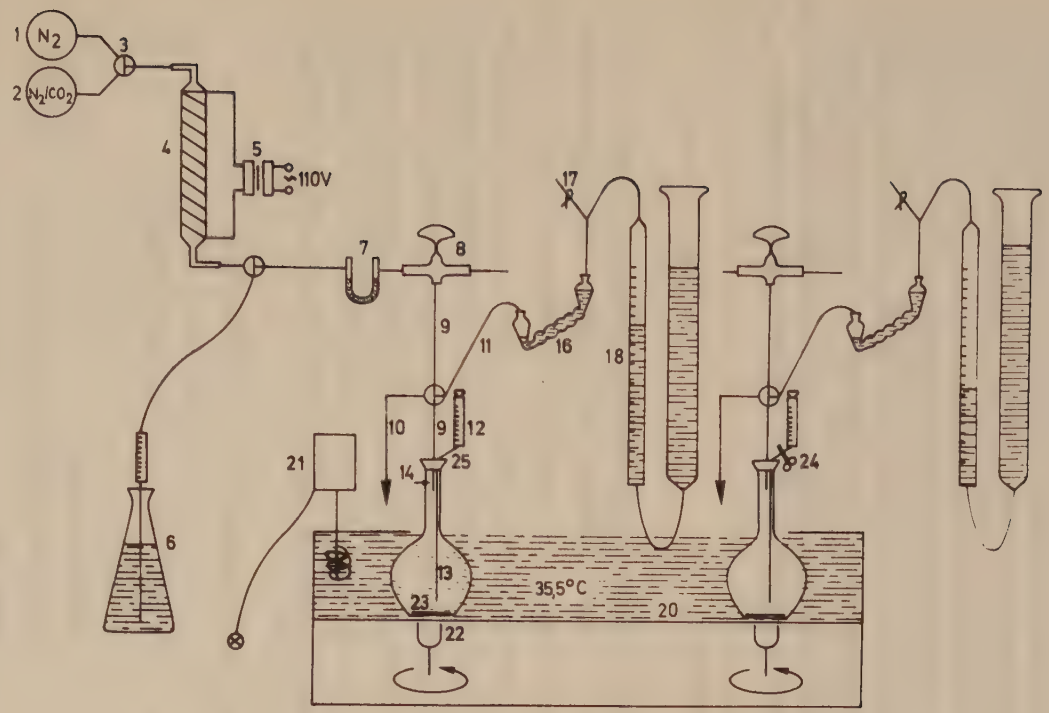


Abb. 2 Apparatur zur Analyse des Gärungsverlaufs bei C. kluyveri

Legende siehe Seite 14.

Legende zu Abb. 2:

(1) Stickstofflasche; (2) Gemisch aus 80 % N_2 und 20 % CO_2; (3) 3-Wege-Hahn; (4) Kupferturm zur O_2-Entfernung aus Gasen; (5) Transformator; (6) Wassergefäß mit eintauchender Kanüle zur optischen Kontrolle und als Regulierventil beim Äquilibrieren; (7) mit Watte gefülltes U-Rohr, Staubfilter; (8) Mikro-Regulier-Ventil "Aquarienhahn"; (9) (9') Gaszuleitungen; (10) Anschluß zum Begasen; (11) Leitungen zum Bubble-Röhrchen; (12) Spritze zur Probenentnahme; (13) Entnahmeschlauch PVC; (14) Kanüle zur Ableitung von Wasserstoff; (15) Kulturgefäß, 500 ml Meßkolben; (16) Bubble-Röhrchen gefüllt mit 7 ml 4 N KOH; (17) Leitung mit Klemme zum Ablassen von H_2; (18) 100 ml Bürette, 0,1 ml-Markierung, mit Wasser gefüllt; (19) Ausgleichsgefäß, offen; (20) Wasserbad, 35,5° C; (21) Thermostat; (22) Rühreinheit mit 6 Rührern; (23) Magnetrührer, teflonbeschichtet; (24) Scherenschlauchklemme; (25) Anschluß zur Probenentnahme und Begasen.

2.9. Gärapparatur

Zur Aufnahme von Gärbilanzen wurde in Anlehnung an ein Verfahren von THAUER et al. (1968) eine Gärapparatur aufgebaut, die eine Probennahme während des Wachstums bei gleichzeitiger H_2-Messung erlaubte (SCHWAN, Diplomarbeit Göttingen, 1972). Durch ein System von Drei-Wege-Hähnen konnte N_2 in die Kulturgefäße geleitet und so ein definiertes Volumen Probe steril entnommen werden. Das bei der Gärung entwickelte Gasgemisch wurde durch KOH geleitet (CO_2-Absorption) und der verbleibende Wasserstoff konnte in wassergefüllten Büretten, nach dem Prinzip kommunizierender Röhren nach Temperatur- und Druckkorrektur, gemessen werden.

2.10. Essigsäurebestimmung (HOLZ und BERGMEYER, 1970)

Reagenzien:
1. Puffer (0,1 M TEA, pH 7,4; 20 mM Mg^{++})
2. 84 mM ATP
3. 4 M Hydroxylamin
4. 0,6 M TCA
5. 60 mM $FeCl_3$
6. 5 mM Acetat-Standard
7. 5 mg Acetatkinase/ml

0,5 ml des Überstandes einer zentrifugierten Bakteriensuspension wurden mit 4,5 ml dest. Wasser gemischt und 0,2 ml dieser Lösung im Test eingesetzt. In Zentrifugengläser wurden pipettiert: 0,5 ml Puffer (1), 0,1 ml ATP (2), 0,2 ml Hydroxylamin (3), 0,2 ml Probe bzw. Standard (6) und 0,02 ml Acetatkinase (7). Nach dem Mischen wurden die Zentrifugengläser mit Parafilm verschlossen und genau 90 min im Wasserbad bei 35° C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 ml TCA (4) abgestoppt und 4 ml $FeCl_3$ (5) zugegeben. Es wurde gemischt und die Extinktion der Probe (E_P), des Proben-Leerwertes (E_{PL}) und des Standards (E_{St}) gegen den Reagenzienleerwert gemessen (Zeiss PL 4, Meßstrahlung 490 nm, d = 1 cm Küvetten). Der Gehalt der Probe an Acetat wird durch Bezug auf die Extinktion des Standards berechnet.

$$c = \frac{(E_P - E_{PL}) \cdot 0{,}3 \cdot F}{(E_{St})} \quad (g/l)$$

F = Verdünnungsfaktor

0,3 = Konzentration der Standardlösung als Essigsäure (g/l)

2.11. Äthanolbestimmung (BERNT und GUTMANN, 1970)

Reagenzien: Biochemica-Test-Combination "Blutalkohol" (Boehringer, Mannheim)

1. 75 mM Pyrophosphatpuffer, pH 8,7
   75 mM Semicarbazid
   21 mM Glycin
2. 24 mM NAD
3. 30 mg Alkoholdehydrogenase/ml

0,5 ml des Überstandes einer zentrifugierten Bakteriensuspension wurden 1 : 100 verdünnt und davon 0,2 ml im Test eingesetzt. In Küvetten wurden

3 ml Puffer (1), 0,1 ml NAD (2), 0,2 ml Probe bzw. dest. Wasser gemischt und die Extinktion E_1 im Zeiss Photometer PL 4 bei 365 nm und d = 1 cm gegen den Leerwert abgelesen. Anschließend wurden 0,02 ml ADH-Lösung (3) zugegeben. Nach dem Mischen wurde in Reagenzgläser umgefüllt, diese mit Parafilm verschlossen und genau 25 min bei 37° C inkubiert. Hierauf erfolgte die Extinktionsmessung gegen den Leerwert E_2.

Berechnung: $c = \Delta E \cdot 5{,}03 \cdot F$ (µMol/ml)

$\Delta E = E_2 - E_1$

F = Verdünnungsfaktor

5,03 = Faktor bei 365 nm

Zur Kontrolle wurde jeweils eine Äthanolstandardlösung (Firma Merck, Darmstadt) mitgeführt.

2.12. Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Gärungsprodukte Butter- und Capronsäure erfolgte gaschromatographisch in Anlehnung an das Anaerobe Laboratory Manual (1972) (L. V. HOLDEMAN und W. E. C. MOORE, Hrsgbr., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA).

2 ml des Probenmaterials wurden mit 0,1 ml konz. Phosphorsäure angesäuert, mit 1 ml Äthyläther etwa 20mal geschüttelt und 5 min bei 4 000 upm zentrifugiert. Nach Dekantieren der Ätherphase wurde zur Bindung des restlichen gelösten Wassers $MgSO_4$ zugegeben. Nach 10 min Stehen wurden 5 µl der wasserfreien Butyrat- und Capronat-enthaltenden Ätherschicht in das Gerät gespritzt. Jede Bestimmung erfolgte mindestens zweimal. Standardlösungen mit bekanntem Butter- und Capronsäuregehalt dienten zur Aufnahme von Eichkurven. Diese wurden zu jeder Testreihe täglich neu aufgenommen.

Gerät:	Perkin-Elmer 900 Gaschromatograph
Säule:	12 % DEGS auf Chromosorb G, Metallsäule 1/8" x 4 m
Injektor:	250° C
Verteilerraum:	250° C
Trägergas:	N_2, 34 psi Vordruck, Durchflußrate 18 - 20 ml/min, H_2 20 psi, Luft 30 psi.
Säulen:	170° C isotherm

Der Gaschromatograph war mit einem Hitachi-Schreiber, Modell 196, und einem Integrator (Hewlett Packard 3370 B) verbunden.

2.13. Anreicherung von Ferredoxin aus C. pasteurianum

Die Ferredoxinanreicherung erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von MORTENSON (1964).

Lyophilisiertes Zellmaterial von C. pasteurianum wurde in einer Büchnerflasche mit dest. Wasser versetzt (10 ml H_2O/g Trockengewicht) und unter N_2-Strom 60 min bei Raumtemperatur magnetisch gerührt. Alle Schritte hiernach wurden bei 4° C durchgeführt. Das Autolysat wurde auf 4° C abgekühlt und ein gleiches Volumen Aceton zugegeben. Nach 15 min Rühren wurde die Mischung 20 min bei 4° C und 11 000 upm abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde verworfen, der klare graubraune Acetonüberstand auf eine gegen 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 äquilibrierte DEAE-Säule (2,5 x 15 cm Säulenbett) gegeben. Ferredoxin blieb als dunkelbraune Bande am oberen Säulenrand, während Aceton, Protein- und Flavinkomponenten durchliefen. Nach dem Waschen mit 0,2 M Tris-HCl, pH 8 wurden noch weitere Extraktreste eluiert und das Säulenmaterial von nicht erwünschten Proteinen befreit. Anschließend wurde mit 0,25 M Tris-HCl, pH 8 so lange gewaschen, bis sich die Ferredoxinbande etwa 1 cm oberhalb des unteren Säulenrandes ausgebreitet hatte. Vollständig eluiert wurde Ferredoxin mit 0,5 M Tris-HCl, pH 8. Fraktionen mit einer Absorptionsrate ($E_{390\ nm}/E_{280\ nm}$,

d = 1 cm) größer als 0,4 wurden vereinigt und 14 - 16 Stunden bei mehrfachem Pufferwechsel gegen 0,01 M Tris-HCl, pH 8 dialysiert. Zur weiteren Reinigung und Konzentrierung wurde die Ferredoxinlösung auf eine gegen 0,1 M Tris-HCl, pH 8 äquilibrierte DEAE-Säule (1 x 8 cm Säulenbett) gegeben. Der Vorgang des stufenweisen Eluierens, der Dialyse und Extinktionsmessung, wurde zweimal wiederholt und das (Red-ox) Spektrum des konzentrierten Ferredoxins aufgenommen. Der Proteingehalt wurde anhand des Extinktionskoeffizienten $E^{1\%}_{1cm} = 34$ (MORTENSON, 1964; LOVENBERG et al., 1963) bei 390 nm und einem Molekulargewicht des Ferredoxin von 6 000 bestimmt. Ferredoxinanreicherungen nach dieser Methode hatten einen Proteingehalt von etwa 3 - 4 mg/ml; die als Reinheitskriterien herangezogenen Absorptionsquotienten (390/280 nm) betrugen 0,71 - 0,73.

2.14. Entfernung von Ferredoxin und Flavodoxin aus zellfreien Extrakten

Zellfreie Extrakte wurden wie unter 2.4. beschrieben hergestellt. Zur Entfernung des Ferredoxins oder Flavodoxins wurde dem Extrakt feuchte, gegen Puffer äquilibrierte DEAE-Cellulose zugesetzt. Molarität und pH des Puffers waren versuchsabhängig. Die Mischung wurde bei anaerober Atmosphäre (N_2 oder H_2) 15 min bei 4° C gerührt und anschließend zur Abtrennung der ferredoxin- bzw. flavodoxinhaltigen Cellulose 20 min bei 11 000 upm zentrifugiert. Der Überstand ergab den coenzymfreien Extrakt, die grünschwarze (Ferredoxin) bzw. gelbe (Flavodoxin) DEAE-Cellulose wurde verworfen.

2.15. Konzentrieren von Proteinlösungen

Konzentrierungsschritte wurden ausnahmslos in Ultrafiltrationszellen und mit Membranen der Firma Amicon (Oosterhout, Holland) durchgeführt.

Ultrafiltrationsgeräte: UF Zelle 12
UF Zelle 52
UF Zelle 202

Die bei den ersten Anreicherungsschritten anfallenden größeren Volumina (bis 1 500 ml) wurden (fraktioniert) mit dem Hochleistungs-UF System TCF 10 konzentriert. Zur Filtration wurde stets das Endpunkt-Überwachungsgerät EC 20 mit verwendet. Alle Filtrationen wurden mit Stickstoffdruck bei 4° C unter Berücksichtigung des vom Kammertyp abhängigen Drucks und ausschließlich mit Ultrafiltrationsmembranen einer Durchlaßgrenze von 10 000 Dalton (PM 10) durchgeführt.

2.16. Dialyse

Volumina bis 50 ml wurden bei 4° C und mehrmaligem Pufferwechsel abgedunkelt in Union Carbide-Schläuchen (Chicago/USA) dialysiert. Größere Mengen wurden in den oben beschriebenen Amicon-Kammern und Membranen bei konstantem Volumen diafiltriert, bis das Ultrafiltrat etwa das dreifache des Ausgangsvolumens erreicht hatte. Dialyse mit der Hollow Fiber Patrone H 1 DP 10 der Firma Amicon fand wegen des System-bedingten Volumenverlustes nur bei den größeren Volumina der ersten Anreicherungsschritte und in Ausnahmefällen Verwendung.

2.17. Anreicherung von Flavodoxin aus Eisenmangel-Zellen

Die gesamte Anreicherung wurde, bedingt durch die Lichtempfindlichkeit der Flavine, möglichst abgedunkelt und bei gedämpftem Licht durchgeführt.

2.17.1. Rohextrakt

Im allgemeinen wurden 70 - 85 g gefriergetrocknete Eisenmangel-Zellen (Zellausbeute von 800 - 1 000 l Nährlösung) als Ausgangsmaterial einge-

setzt. Die lyophilisierten Zellen wurden durch Autolyse bei Zimmertemperatur aufgeschlossen (siehe 2.4.1.), der hieraus resultierende Rohextrakt hatte ein Volumen von 1 600 ml, pH 6,2. Alle Schritte hiernach wurden bei 4° C durchgeführt.

2.17.2. DEAE-Cellulose-Chromatographie im Batch-Verfahren

Zum Rohextrakt wurden 80 g DEAE-Cellulose (DE 52, Whatman Biochemicals Ltd., Maidstone, England) gegeben und der pH mit 3 N HCl auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde die Extrakt-Cellulose-Mischung 15 min unter H_2-Strom magnetisch gerührt, 20 min bei 4 000 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierte flavodoxinhaltige Cellulose wurde mit 800 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,3 gewaschen, wie oben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Flavodoxin wurde nun mit 800 ml 0,8 M KCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7,3 eluiert und die DEAE-Cellulose durch Zentrifugation abgetrennt. Der gelb-bräunliche Flavodoxinextrakt (850 ml) wurde in einer Amicon Ultrafiltrationszelle (siehe 2.15.) bei Verwendung einer PM 10 Membran mit 20 mM Tris-HCl, pH 7,3 von überschüssigen Salzen befreit (Diafiltration).

2.17.3. DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie

Der dialysierte Extrakt (1 080 ml) wurde auf eine Chromatographiesäule (5 x 60 cm, Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) gegeben, die mit äquilibrierter DEAE-Cellulose gefüllt war (50 mM Tris-HCl, pH 7,3, Füllhöhe 14 cm). Flavodoxin adsorbierte als rotbraune Bande am oberen Säulenrand. Die Säule wurde mit 800 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,3 gewaschen und danach ein linearer KCl-Gradient angelegt. Die Niveaugefäße enthielten 50 mM Tris-HCl, pH 7,3 bzw. 0,8 M KCl im gleichen Puffer. Fraktionen von etwa 10 ml wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Ultrorac 7000, Firma LKB Produkter AB, Stockholm, Schweden) aufgefangen und gleichzeitig deren optische Dichte mittels eines Ultraviolet Ab-

sorptiometer Uvicord II (LKB Produkter) aufgezeichnet. Die als gelbe Bande eluierten Flavodoxin-Fraktionen (160 ml) wurden gegen 20 mM Tris-HCl, pH 7,3 dialysiert (Amicon Ultrafiltrationszelle) und anschließend auf 32 ml eingeengt.

2.17.4. Bio-Gel P-60 Chromatographie

Die konzentrierte Flavodoxinlösung wurde auf eine mit Bio-Gel P-60 (Firma Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) gefüllte Säule gegeben, die gegen 20 mM Tris-HCl, pH 7,3 äquilibriert worden war (2,6 x 40 cm, Füllhöhe 30 cm). Es wurde mit dem gleichen Puffer gewaschen und die opt. Dichte der Fraktionen aufgezeichnet. Flavodoxin wurde eluiert, nachdem 77 ml Puffer durchgelaufen waren. Die aktivsten orangeroten Fraktionen wurden vereinigt (40 ml).

2.17.5. Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Das Bio-Gel Eluat wurde langsam mit pulverisiertem Ammoniumsulfat (AS) unter mäßigem Rühren auf 65 % Sättigung gebracht. Ein weißer Niederschlag wurde durch 10 min Zentrifugation bei 17 000 upm entfernt und der Überstand auf 100 % AS-Sättigung gebracht. Es bildete sich ein orangeroter amorpher Niederschlag, der durch Zentrifugation gesammelt und nach Suspendierung in 30 ml 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,3 gegen 2 l des gleichen Puffers 14 Stunden dialysiert wurde.

2.17.6. Erste Kristallisation

Die salzfreie Flavodoxinlösung wurde wiederum bis 68 % mit Ammoniumsulfat gesättigt, eine dabei auftretende leichte Trübung durch Zentrifugation entfernt und der Überstand in einem Zeitraum von 2 Tagen mit AS bis auf 82 % Sättigung gebracht. Ein orangeroter Niederschlag von kristalliner und amorpher Konsistenz wurde durch Zentrifugation gesammelt, der kräftig

rosa gefärbte Überstand zur näheren Untersuchung aufbewahrt. Das Sediment wurde in 30 ml 50 mM KPO_4-Puffer gelöst und wie oben dialysiert.

2.17.7. Zweite Kristallisation

Die dialysierte Flavodoxinlösung wurde mit AS bis zu 75 % Sättigung versetzt und die Lösung stehen gelassen. Nach einem Tag bildeten sich langsam gelbe hexagonale Kristalle, die durch Zentrifugation gesammelt wurden. Der Überstand wurde auf 82 % AS gebracht und die erneut sich bildenden Kristalle nach weiteren 2 Tagen geerntet. Die Flavodoxinkristalle wurden mit 90 % Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen und in 30 ml 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,3 suspendiert. Diese Lösung wurde 14 Stunden gegen 2 l des gleichen Puffers dialysiert und anschließend in kleinen Volumina (2 ml) bei -20° C aufbewahrt.

Ausbeute: 120 - 130 mg elektrophoretisch reines Flavodoxin aus 70 - 80 g Trockenzellen.

2.18. Elektrophorese

2.18.1. Analytische Disk-Elektrophorese

Untersuchungen und Nachweis der Homogenität von Proteinproben (Flavodoxin) erfolgten in Polyacrylamid-Gelen. Die Synthese der Gele wurde in Glasröhrchen von 14 cm Länge und 6 mm Innendurchmesser durchgeführt. Hierzu wurden für das Obergel (Sammelgel) 0,2 ml und für das Untergel (Trenngel) 2,5 ml zur Polymerisation gebracht. Zur Durchführung der Elektrophorese wurden Geräte der Firma WTW, Weilheim, benutzt (Netzgerät GT 90, Trennkammer DEA 90). Eine Schlauchpumpe Typ 100 (Firma Heidolph, Kelkheim) sorgte für die nötige Pufferumwälzung zwischen Anoden- und Kathodenraum der wassergekühlten Trennkammer. Der Bedienungs- und Arbeitsanleitung für Elektrophoresegeräte der Firma WTW wurden folgende

Gelsysteme entnommen:

Sammelgel

A)	1 M H_3PO_4	39	ml
	Tris	4,95	g
	TEMED	0,46	ml
	H_2O dest.	ad 100	ml
B)	Acrylamid	10,0	g
	Bis	2,5	g
	H_2O	ad 100	ml
C)	Riboflavin	4,0	mg
	H_2O	ad 100	ml
D)	Saccharose	40,0	g
	H_2O	ad 100	ml

Mischungsverhältnis A : B : C : D = 1 : 2 : 1 : 4 (v/v/v/v)

Trenngel I (7,5 %, pH 8,0)

A)	1 N HCl	48	ml
	Tris	6,85	g
	TEMED	0,46	ml
	H_2O	ad 100	ml
B)	Acrylamid	30,0	g
	Bis	0,8	g
	H_2O	ad 100	ml
C)	Per	0,14	g
	H_2O	ad 100	ml

D) H_2O dest.

Mischungsverhältnis A : B : C : D = 1 : 2 : 4 : 1 (v/v/v/v)

Trenngel II (15 %, pH 8,0)

A)	1 N HCl	48 ml
	Tris	6,85 g
	TEMED	0,46 ml
	H_2O	ad 100 ml
B)	Acrylamid	60,0 g
	Bis	0,4 g
	H_2O	ad 100 ml
C)	Per	0,14 g
	H_2O	ad 100 ml

D) H_2O dest.

Mischungsverhältnis A : B : C : D = 1 : 2 : 4 : 1 (v/v/v/v)

Elektrodenpuffer: 5,52 g Diäthylbarbitursäure
1 g Tris
H_2O ad 1 000 ml

Durchführung und Auswertung der analytischen Disk-Elektrophorese

Proteinlösungen wurden mit Saccharose zu 10 %iger Endkonzentration beschwert und einige Kristalle Bromphenolblau jeder Probe zugegeben. 20 - 140 µg der farbstoffmarkierten Proteinlösung wurden auf das Sammelgel aufgetragen und die Glasröhrchen in der mit Elektrodenpuffer gefüllten Trenn-

kammer einer Stromstärke von 4 mA/Röhrchen ausgesetzt. Die Laufzeit betrug 45 Minuten. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Anfärbung der Proteinbanden in Farbstofflösungen inkubiert.

A) 2 Stunden in Coomassie Brilliant Blue (nach KOENIG et al., 1970).
10 ml 1 %iger Lösung von Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg) in 400 ml einer Mischung von 60 g TCA in 800 ml H_2O, 200 ml Methanol und 70 ml Eisessig.
oder
B) 15 min in einer Lösung von 1 % Amidoschwarz 10 B in 7 %iger Essigsäure und 30 % Methanol.

Entfärbt wurde mindestens 24 Stunden (37° C) bei mehrfachen Wechsels einer Mischung aus 120 ml Methanol, 20 ml Eisessig und 280 ml H_2O bei der Coomassie Blue Färbung bzw. mit 7 %iger Essigsäure bei der Amidoschwarz-Färbung.

Die angefärbten Proteinbanden der Gele wurden mit einem Flying Spot Densitometer (Firma Vitatron, Holland) ausgewertet und anschließend in 3 %iger Essigsäure bei 4° C aufbewahrt.

2.18.2. SDS-Plattenelektrophorese

Die Methode der vertikalen Plattenelektrophorese wurde in der von STEGEMANN (1972) entwickelten Apparatur durchgeführt.

Zusammensetzung der 10 %igen Gele:

Acrylamid	15 g
Bis	0,3 g
Na-Sulfit (wasserfrei)	50 mg
TEMED	0,1 ml
Ammoniumpersulfatlösung (2 %)	2,8 ml
0,1 % SDS in 25 mM $NaPO_4$-Puffer, pH 7,1	150 ml

Elektrophorese- und Gelpuffer:

A)	179,1 g	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	ad 1 000 ml dest. Wasser
B)	69,0 g	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	ad 1 000 ml dest. Wasser

Eine Gebrauchslösung wurde durch Mischen von 34,8 ml A) und 15,2 ml B) hergestellt, auf 1 000 ml dest. Wasser aufgefüllt und darin unter leichtem Schütteln 1 g SDS (= 0,1 %) gelöst.

Die Gelkomponenten wurden nacheinander in dem Puffer aufgelöst und die Mischung 1 - 2 min in einer Saugflasche entgast. Anschließend wurde die Gellösung rasch luftblasenfrei in die Kammer gegossen und der Taschenformer (8 Taschen) eingesetzt. Dieser konnte nach beendeter Polymerisation entfernt und die Kammer aufrecht in eine Schale gestellt werden. Die Schale (Anodenraum) und die wassergekühlte Kammer (Kathodenraum) wurden mit Puffer gefüllt, der mittels einer Schlauchpumpe umgewälzt wurde.

Vorbereitung der Test- und Referenzproteine:

Flavodoxin lag nach den Kristallisationsschritten in KPO_4-Puffer vor. Um ein Ausfallen des SDS mit K-Ionen zu verhindern, mußte die Testlösung auf $NaPO_4$-Puffer umäquilibriert werden. Die Referenzproteine (Eichproteine, Combithek Boehringer, Mannheim) und Flavodoxin wurden in $NaPO_4$-Puffer

gelöst (1 mg/ml), mit 1 % SDS und 1 % MET versetzt und 10 min bei 60° C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde über Nacht gegen 1 : 5 verdünnten, 0,1 % SDS enthaltenden Elektrophoresepuffer dialysiert. Hierauf wurden die Proben mit Saccharose beschwert, mit Bromphenolblau markiert und 40 - 80 µl der präparierten Proteinlösungen in die Geltaschen gefüllt. Der Elektrophoreselauf erfolgte 5 Stunden bei 80 mA und 130 Volt. Die anschliessende Färbung und Auswertung war analog zur Disk-Elektrophorese-Methodik.

2.19. Molekulargewichtsbestimmung

2.19.1. Gelfiltration auf Sephadex G-75

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte nach ANDREWS (1964). Für die Chromatographie wurde eine Sephadex G-75 Säule (2,6 x 100 cm, Füllhöhe 80 cm) benutzt, die gegen 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,3 äquilibriert worden war. In 1,5 ml Flavodoxinlösung (3,5 mg Protein/ml) wurden 2 mg Ferritin, 7 mg Rinderserumalbumin, 8 mg Ovalbumin, 8 mg Chymotrypsinogen A und 6 mg Cytochrom c der Boehringer Combithek gelöst. Ferritin diente, bei einem Molekulargewicht von 540 000 zur Bestimmung des Ausschlußvolumens V_o. Die Enzymmischung wurde mit Saccharose beschwert und durch Unterschichten auf die Säule aufgetragen. Um das Volumen der Fraktionen konstant zu halten (1,552 ml), wurde die Niveaudifferenz während des Laufs hydrostatisch reguliert. Die Durchflußrate betrug 9 ml/Std., der Arbeitsdruck lag bei 11 cm Wassersäule. Ferritin wurde bei 425 nm, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Rinderserumalbumin bei 280 nm gemessen; die Flavodoxinbestimmung erfolgte bei 445 nm, die des Cytochrom c bei 412 nm. Nach Bestimmung des Ausschlußvolumens (V_o) wurde anhand der Peakmaxima der Proteine ihr Elutionsvolumen (V_E) berechnet.

2.19.2. SDS-Plattenelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung

Zur Durchführung gelten die unter 2.18.2. beschriebenen Angaben. Bei der Ermittlung des Molekulargewichtes wurden die Rf-Werte (Mobilität) der Referenzproteine gegen den Logarithmus ihrer (bekannten) Molekulargewichte aufgetragen und durch eine Gerade verbunden. Nach Integration des Flavodoxin-Rf-Wertes konnte der logarithmische Zahlenwert des gesuchten Molekulargewichtes ermittelt werden.

2.20. Spektrophotometrische Untersuchungen

2.20.1. Absorptionsspektren

Die spektralen Eigenschaften von Flavodoxin im oxidierten und reduzierten Zustand wurden im Pye-Unicam Doppelstrahlphotometer SP 1800 gemessen (Pye-Unicam Limited, Cambridge, England) und von einem angeschlossenen Schreiber (Unicam AR 25 linear Recorder) aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten bei konstanter Spaltbreite und variabler Wellenlänge von 200 - 800 nm. Bei allen Bestimmungen, auch im sichtbaren Bereich, wurden Quarzküvetten (d = 1 cm) verwendet und stets gegen das in der Meßküvette verwendete Lösungsmittel gemessen.

2.20.2. Differenzspektren

Bei Messungen von reduziertem minus oxidiertem Flavodoxin wurde nicht wie oben die Extinktion, sondern die Transmission der Lösung bestimmt. Die Küvette mit dem zu reduzierenden Flavodoxin wurde voll gefüllt, ein paar Körnchen Na-Dithionit zugegeben und mit einer gasdichten Gummikappe luftblasenfrei verschlossen.

2.20.3. Zirkulardichroismus (CD)-Spektren

Wandert linear polarisiertes Licht durch ein optisch aktives Medium, sind die Extinktionen im UV-Spektrum für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht unterschiedlich. Da dieser Zirkulardichoismus bei Molekülen mit einer stark absorbierenden Gruppe (hier: FMN) als ein konstanter Faktor gewertet werden kann, wurden zur Charakterisierung von Flavodoxin auch die CD-Eigenschaften untersucht. Die Spektren wurden in einem Cary 60 Recording Spectropolarimeter mit Circular Dichroism Accessory 6003 (Cary Instruments, Monrovia, Kalifornien) bei Verwendung zylindrischer Quarzküvetten (d = 1 cm) aufgenommen.

Auswertung: Zirkulardichroismus wurde als relative Größe der Elliptizität Θ, ausgedrückt in Grad, gemessen.

Wenn Θ° die gemessene Elliptizität in der Dimension Grad repräsentiert, kann die molekulare Elliptizität Θ mit folgender Gleichung definiert werden:

$$[\Theta] = \frac{\Theta^{\circ}}{10} \times \frac{M}{l \cdot C'}$$

M = Molekulargewicht in Gramm

C' = Konzentration in Gramm/cm^3

l = Schichtdicke der Probelösung in cm

Θ hat die Dimension Grad-cm^2 x $Decimole^{-1}$.

2.20.4. Temperatur-Spektren

Die thermische Dissoziation des FMN vom Apoprotein zur Bestimmung des Dissoziationspunktes (hier mit D_T bezeichnet) wurde in einem Pye Unicam

SP 1800 Spektrophotometer mit Küvettenwechselautomatik durchgeführt. Die Temperatur des Küvettenhalters wurde mit einem Lauda U_3-S 15 Thermostat, gekoppelt mit einem Lauda P 120 linearen Temperatur-Programmgeber (Firma Lauda Meßgeräte-Werk, Lauda, Tauber) mit einer Rate von 60° C/Std. erhöht. Während des Aufheizens wurde die Temperatur der Testlösung direkt mit Temperatur-Sensoren und einem Doric Digital Thermometer DS 100 T 5 (Firma Doric Scientific Corp., USA) gemessen. Bei konstanter Wellenlänge von 445 nm wurden die Extinktions- und Temperaturwerte jeder Probe und Vergleichslösung im zeitlichen Abstand von 1 min gemessen und von einem PA BCD-Moduprint (Firma Practical Automation, Shelton, Connecticut, USA) ausgedruckt. Der Dissoziationspunkt D_T wurde nach Extinktionskorrektur (erforderlich aufgrund thermischer Ausdehnung des Lösungsmittels) graphisch bestimmt. Gemessen wurde entweder bei konstanter Wellenlänge und Digitalanzeige der Extinktion bei variabler Temperatur oder bei konstanter Temperatur und Aufzeichnung des Spektrums mittels eines angeschlossenen Schreibers von 300 - 700 nm.

2.20.5. Fluoreszenz-Spektren

Das Fluoreszenz-Spektrum von Flavodoxin wurde im Hitachi Fluoreszenz Spektrophotometer 204 mit Xenon Power Supply 150 (Firma Hitachi Ltd., Tokio, Japan) bestimmt und mit einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet. Die Methode wurde der Hitachi Arbeitsanleitung entnommen. Nach Ermittlung der Anregungswellenlänge (Exciter Spektrum), bei der die stärkste Fluoreszenz auftrat, wurden die Emissionsspektren in d = 1 cm Küvetten aufgenommen.

2.21. Anaerobe Titration von Flavodoxin mit Na-Dithionit

Eine Küvette mit Flavodoxin in 40 mM Glycin-NaOH Puffer, pH 8,7 wurde mit einer Gummikappe verschlossen, mit zwei Kanülen durchstochen und 10 min mit N_2 begast. Das Spektrum des oxidierten Flavodoxins wurde aufge-

nommen, die Gummikappe mit einer feinen Kanüle durchstochen und aus einer 1 ml-Spritze 0,015 ml einer 1 mM Na-Dithionitlösung zugesetzt. Nach Aufnahme des Spektrums wurden weitere 300 nMole Na-Dithionit in 0,01 ml Portionen bei jeweiliger Aufzeichnung des Spektrums zugegeben.

2.22. Photoreduktion und Reoxidation von Flavodoxin

Die anaerobe Photoreduktion von Flavodoxin im alkalischen und sauren Milieu wurde in Gegenwart von EDTA nach einem Verfahren von MASSEY und PALMER (1966) durchgeführt.

A) 0,15 M Na-Acetat pH 5,7
0,06 M EDTA
Flavodoxin in KPO_4-Puffer, pH 7,3

B) 40 mM Glycin-NaOH pH 9,7
60 mM EDTA
Flavodoxin in KPO_4-Puffer, pH 7,3

Eine mit Schliff versehene Quarzküvette wurde mit der jeweiligen Testlösung so gefüllt, daß beim Aufsetzen des Schliffstopfens Flüssigkeit verdrängt und die Küvette anaerob verschlossen war. Das Spektrum des oxidierten Flavodoxins wurde im Pye Unicam Doppelstrahlphotometer SP 1800 gegen einen Nullwert aufgenommen. Anschließend wurde die Meßküvette im Abstand von 7 cm einer Lichtquelle ausgesetzt (Shandon Labortechnik) und nach definierten Beleuchtungszeiten Spektren vom Oxidationszustand des Flavodoxins bzw. der prosthetischen Gruppe aufgenommen.

Reoxidationsspektren wurden ermittelt, indem photoreduziertes Flavodoxin durch kurzzeitiges Öffnen und Verschließen der Küvette dem Luftsauerstoff ausgesetzt wurde.

2.23. Extinktionskoeffizienten

Oxidiertes Flavodoxin hat Absorptionsmaxima bei 272 nm, 377 nm und 445 nm; Flavodoxin-Semichinon bei 350 nm und 580 nm. Die Extinktionskoeffizienten wurden in Anlehnung an Verfahren von MAYHEW und MASSEY (1969) ermittelt.

2.23.1. FMN-Dissoziation durch TCA-Extraktion

Zu 0,54 ml Flavodoxinlösung (1,29 mg/ml) wurden 0,06 ml 50 %ige TCA gegeben und die prosthetische Gruppe, wie unter 2.25. beschrieben, quantitativ abgetrennt. Ebenfalls 0,54 ml Flavodoxinlösung wurden mit H_2O auf ein gleiches Volumen wie das TCA-behandelte Flavin gebracht und von dem nativen Flavodoxin und dissoziierten FMN die Absorption gemessen. Anhand der bekannten molaren Extinktionskoeffizienten (ε) von FMN konnten die Werte für das proteingebundene FMN ermittelt werden.

$FMN_{445\ nm}$ in wässriger Lösung = 12 200 (WHITBY, 1953)
$FMN_{445\ nm}$ in 3 % TCA = 11 100 (HINKSON, 1968)

2.23.2. Thermische Dissoziation von FMN bei variabler Temperatur

Von oxidiertem Flavodoxin in 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,0 wurde das Spektrum im Bereich von 330 - 690 nm aufgenommen und die Lösung anschließend aufgeheizt (siehe 2.20.4.). Absorptionsspektren wurden in konstanten Temperaturbereichen bei 25°, 45°, 65°, 85° und 95° C gemessen. Die Herabsetzung der Flavinkonzentration als Folge der Ausdehnung des Lösungsmittels wurde berücksichtigt und die Extinktion entsprechend korrigiert. Das in wässriger Lösung vorliegende FMN (ε 445 nm = 12 200) wurde auf die Absorption des Null-Spektrums bezogen und so die Extinktionskoeffizienten des FMN in Flavodoxin ermittelt.

2.23.3. Thermische Dissoziation von FMN bei konstanter Temperatur

Die Extinktion (445 nm) einer Flavodoxinlösung in einer luftdicht verschlossenen und mit einem Thermofühler versehenen Küvette wurde gemessen und die Küvette im Dunkeln aufbewahrt. Dann wurde der Küvettenhalter auf 95,5° C aufgeheizt (siehe 2.20.4.), die Küvette in den Halter gesetzt und die Extinktion (445 nm) bei konstanter Temperatur gegen die Zeit aufgetragen. Die Dissoziation des FMN war bereits innerhalb 10 min vollständig abgelaufen, die darauf folgende Abnahme der Absorption war durch Denaturierung des FMN erklärbar. Die Meßdaten wurden graphisch auf die Zeit Null extrapoliert und der ausdehnungskorrigierte Extinktionswert diente zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten.

2.23.4. Graphische Extrapolation der Semichinon-Spektren

Die in Gegenwart von Licht und EDTA eintretende Bildung des Flavodoxin-Semichinons wurde photometrisch aufgenommen. Die Absorption des Semichinon-Peaks bei 580 nm wurde gegen die Absorptionswerte bei 445 nm aufgetragen. Durch graphische Extrapolation konnte, bei Kenntnis der Flavodoxinkonzentration, der Extinktionskoeffizient für vollständig gebildetes Semichinon errechnet werden. Analog hierzu wurden die Koeffizienten für 350 nm und 377 nm ermittelt.

2.24. Flavinbestimmung in lyophilisierten Zellen (YAGI, 1962)

1. Extraktion der Gesamtflavine

Zellen, die im Eisenmangel und in Gegenwart von Eisen gewachsen waren, wurden geerntet, lyophilisiert und das Trockengewicht bestimmt. Eine definierte Menge Trockenzellen wurde in einem Glas-Potter mit einigen ml 80° C heißem dest. Wasser versetzt. Die Proben wurden 5 min in einer Ultraschall-Schwingwanne beschallt (Frequenz 20 kHz, Firma Schoeller & Co.,

Frankfurt/M.)und anschließend 5 min in einem 80° C heißen Wasserbad inkubiert. Dann wurden die Proben homogenisiert, quantitativ in ein graduiertes Reagenzglas überführt und mit heißem Wasser auf ein Volumen von 20 ml/g Trockengewicht gebracht. Die Extrakte wurden für weitere 15 min bei 80° C inkubiert und gelegentlich mit einem Reagenzglasschüttler aufgerührt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur mußte das Volumen infolge der Verdunstungsverluste wieder auf 20 ml/g Probe gebracht werden. Die Analysen wurden nach kurzem Aufschütteln bei 4 500 upm abzentrifugiert und der kräftig gelbe Überstand zur Bestimmung der Gesamtflavine verwendet.

2. Spektrophotometrische Bestimmung der Flavine

Als Reinheitskriterien der Proben können die Quotienten der optischen Dichten bei 450 nm, 375 nm und 260 nm herangezogen werden.

Tab. 1 Molare Extinktionskoeffizienten (ε) und Extinktionsquotienten von Flavinen (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0)

	ε ($M^{-1}cm^{-1} \times 10^{-3}$)			ε-Quotient		
	260 nm	375 nm	450 nm	260/450 nm	375/450 nm	260/375 nm
Riboflavin	27,2	10,6	12,2	2,27	0,870	2,61
FMN	27,1	10,4	12,2	2,22	0,852	2,60
FAD	37,0	9,3	11,3	3,28	0,823	3,98

(YAGI, 1962)

Wenn ein genügender Reinheitsgrad der Probenlösung sichergestellt ist, kann der Flavingehalt anhand der molaren Extinktionskoeffizienten (ε) berechnet werden. Da ε_{450} für Riboflavin und FMN identisch ist, nicht aber für FAD, muß FAD zu FMN hydrolysiert werden, falls alle drei Flavine in

einer Probe vorhanden sind.

Die Testlösung (a, ml) wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 auf etwa 3 - 20 µg Flavin/ml verdünnt (Totalvolumen b, ml). FAD wurde durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 10 %) und 12stündige Inkubation im Dunkeln bei 37° C zu FMN hydrolysiert. Nachfolgend wurde 5 min bei 4 500 upm zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes in d = 1 cm Küvetten bei 450 nm ermittelt. Als Standard wurde eine Riboflavinlösung unter gleichen Versuchsbedingungen mitgeführt.

3. Auswertung

Der Gesamtflavingehalt der Testlösung, gemessen als Riboflavin, ist durch die Gleichung gegeben:

$$10\,(E_{450}/0{,}325)\,(b/a) = \mu g/ml$$

a = ml Testlösung
b = ml Testlösung nach Verdünnung mit Phosphatpuffer
E = Extinktion der Probe
$E^{1\%}_{1cm}\ 450\ nm_{(Riboflavin)} = 325$

2.25. Dünnschichtchromatographie von Flavinen (KILGOUR et al., 1957)

Zur Identifizierung des Flavins im Flavodoxinmolekül wurde die prosthetische Gruppe mittels Trichloressigsäure (TCA) vom Apoprotein abgespalten und anhand von Referenzflavinen bestimmt. Es wurden 0,54 ml einer 6,43 x 10^{-5} M Flavodoxinlösung bei 4° C unter gedämpften Licht mit 0,06 ml einer 50 %igen TCA versetzt. Nach 5-minütigem Stehen wurde 10 min bei 4° C und 10 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ in ein Reagenzglas überführt und das Präzipitat in 0,6 ml einer 5 %igen TCA resuspendiert. Nach 5-minütigem Stehen wurde wie oben zentrifugiert. Die Überstände I und

II wurden vereinigt und das Pellet verworfen. Der gelbe Flavinextrakt wurde durch Zufügen von 0,6 ml einer 1 M K_2HPO_4-Lösung neutralisiert und mit dest. Wasser auf 2 ml aufgefüllt.

Referenz-Flavine:	FMN	20 µg/ml
	Riboflavin	20 µg/ml
	FAD	100 µg/ml

Da FAD eine erheblich schwächere Fluoreszenz als die beiden anderen Flavine besitzt, wurde hier die Konzentration der Referenzlösung erhöht.

Laufmittel: A) n-Butylalkohol - Essigsäure - Wasser (4 : 3 : 3; v/v/v)
B) tert-Butylalkohol - Wasser (6 : 4; v/v)
C) 5 % Na_2HPO_4 in H_2O

Unter stark gedämpften Licht wurden im Abstand von 2 cm jeweils 4 - 5 µl der Referenz-Lösungen und der Probe aufgetragen (Dünnschicht-Fertigplatten-Cellulose ohne Fluoreszenzindikator; Schichtdicke: 0,1 mm, Firma Merck, Darmstadt). Die Chromatographie erfolgte im Dunkeln bei Zimmertemperatur. Die Flavin-Flecke wurden nach dem Lauf anhand ihrer Fluoreszenz unter UV-Licht (360 nm) sichtbar, sofort umrandet und die Rf-Werte ermittelt.

2.26. Raster-Elektronenmikroskopie

Die in einer 82 %igen Ammoniumsulfat-Lösung aufbewahrten Flavododoxinkristalle mußten zur Elektronenmikroskopie mit Kohlenstoff und Schwermetallen bedampft werden. Hierzu war ein Eintrocknen der Flavodoxin-Ammoniumsulfatlösung erforderlich. Je ein paar Tropfen der Kristallösung wurden auf Aluminium-Objektträger aufgebracht und, um Trocknungseinflüsse auf die Kristallstruktur zu erfassen, unter variierten Bedingungen inkubiert:

A: Über Nacht im Trockenschrank (37° C)
B: Über Nacht bei Zimmertemperatur (24° C)
C: Über Nacht im Kühlschrank (6° C)
D: Unmittelbare Trocknung durch kräftigen Gebläse-Luftstrom.

Die Bedampfung der Objektträger erfolgte mit Kohlenstoff und hierauf mit Gold und Paladium (Gesamtschichtdicke: 200 Å). Die mikroskopischen Untersuchungen wurden im Hochvakuum bei einer Strahlspannung von 5 Kilovolt mit dem Raster-Elektronenmikroskop Cambridge Stereoscan Mark II A vorgenommen (Firma Cambridge Instrument Company, Cambridge, England).

2.27. Bestimmung des Aminosäuregehaltes

2.27.1. Aminosäurebestimmung im Amino Acid Analyzer

Von einem nach den Kriterien der Disk- und SDS-Elektrophorese homogenen Flavodoxinpräparat (150 µg Fld/ml) in 20 mM Tris-HCl, pH 7,3 wurden 1 ml-Portionen in Gegenwart von 6 N HCl in Reagenzgläsern zugeschmolzen. Anschließend erfolgte eine 24-Stunden Hydrolyse bei 100° C Inkubationstemperatur. Nach der Hydrolyse wurde die Probe quantitativ in dickwandige Reagenzgläser überführt und unter Vakuum zur Trockne eingeengt (50° C). Der Rückstand wurde in 0,7 ml eines 0,2 M Na-Citrat-Puffers, pH 2,2 resuspendiert und davon 0,5 ml in den vollkontinuierlichen Probenaufgeber des Analysators gegeben.

Analysator: Modell 120 B Beckman Amino Acid Analyzer
Modell 120 C (Beckman Instruments Inc., Fullerton, Kalifornien)
Modell Unichrom D (Beckman Instruments GmbH, München)

Alle Geräte waren mit dem Photometer B (Küvetten d = 1 cm) und Schreiber ausgerüstet.

Säule: 9 mm Ø 52 cm Säulenbett

Harz: Beckman M 82 (sauer sulfonierter Kationenaustauscher)

Elutionstemperatur: 55° C

Verhältnis Puffer zu Ninhydrin: 1 : 2

Durchlaufzeit: 90 ml/Stunde

Elution: a) Na-Citrat-Puffer, 0,2 M; pH 3,2

b) Na-Citrat-Puffer 0,2 M; pH 4,2

c) Na-Citrat-Puffer, 1,2 - 1,6 M; pH 6,4

Die Auswertung erfolgte anhand von Referenzaminosäuren bekannter Konzentration, die vor und nach den Probeläufen getestet wurden. Erfaßt werden bei dieser Methode alle Aminosäuren außer Tryptophan.

2.27.2 Bestimmung von Tryptophan (SPIES und CHAMBERS, 1949)

Proteinproben (0,1 - 0,15 ml) wurden in Reagenzgläsern für 15 min in einem siedenden Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden 0,1 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 9,2 zugegeben und nachfolgend 0,02 ml Chymotrypsin (1 mg Prot./ml) und 0,02 ml Trypsin (1 mgProt./ml) hinzu pipettiert. Das Gemisch wurde eine Stunde in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert und anschließend das Volumen auf 0,25 ml gebracht. Hierzu wurden 2,25 ml eines Gemisches bestehend aus : 8 ml 23,7 N H_2SO_4 und 30 mg p-Dimethylaminobenzaldehyd in 1 ml 2 N H_2SO_4 hinzugegeben. Die Proben wurden gemischt und 12 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurden 0,025 ml einer 0,045 %igen Na-Nitrit-Lösung zugegeben und die Extinktion (d = 1 cm) nach 30 min bei 600 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer mit synthetischem Tryptophan aufgenommenen Eichkurve.

2.27.3. Bestimmung freier SH-Gruppen mit DTNB nach ELLMAN (1959) und COLLIER (1973)

"Ellman's Reagenz" (5,5'-Dithiobis-2-Nitro-Benzoesäure = DTNB) reagiert mit Thiolen unter Bildung eines farbigen Anions, dessen Absorption bei 412 nm gemessen werden kann. Der Bestimmungsansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml: 0,15 ml natives Flavodoxin oder Apoprotein (siehe 2.23.1.), 0,75 ml 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 8,0, DTNB 1 mM. Die Reaktion wurde 30 min in d = 1 cm Küvetten bei 412 nm verfolgt und mit einem Leerwert korrigiert. Bei der Berechnung der SH-Gruppen lag der von COLLIER (1973) ermittelte molare Extinktionskoeffizient (ε = 14 140 $M^{-1}cm^{-1}$) zugrunde.

2.28. Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus C. pasteurianum (MORTENSON, VALENTINE und CARNAHAN, 1963)

Zur routinemäßigen Aktivitätsbestimmung von Flavodoxin wurde ein Ferredoxin-freier Extrakt von regulär mit Eisen gewachsenen C. pasteurianum-Zellen herangezogen. Dieser Test bot sich wegen seiner Sauerstoff-Unempfindlichkeit und gegenüber der Warburg-Technik einfacheren Methodik an. Der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Komplex katalysiert die Oxidation von Pyruvat zu Acetylphosphat, H_2 und CO_2 (phosphoroklastische Reaktion). Das dabei gebildete Acetylphosphat wurde nach LIPMANN und TUTTLE (1945) als Acetylhydroxamat colorimetrisch bestimmt und so die Aktivität des Ferredoxins und Flavodoxins ermittelt.

18 g gefrorene C. pasteurianum-Zellen wurden mit 40 ml 50 mM KPO_4-Puffer, pH 6,5 aufgetaut, der 10 mM Glutathion (reduziert) und 0,03 % $Na_2S \cdot 9\,H_2O$ enthielt und ein Ferredoxin-freier Extrakt hergestellt.

In Reagenzgläser wurden pipettiert:

0,5 M KPO_4-Puffer, pH 6,5	0,05 ml
1 M Pyruvat	0,05 ml
0,4 mM CoA	0,1 ml
Ferredoxin bzw. Flavodoxin	0 - 0,2 ml
H_2O dest.	0 - 0,2 ml

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,7 ml des Ferredoxin-freien Extraktes gestartet und die Röhrchen 15 min in einem 30° C Wasserbad inkubiert. Danach wurde 1 ml einer neutralen 2 M Hydroxylaminlösung zugegeben (eine 4 M Hydroxylaminlösung wurde kurz vor Gebrauch mit einem gleichen Volumen 4 M KOH neutralisiert) und für weitere 10 min bei 30° C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 3 ml einer Lösung, bestehend aus gleichen Volumina 5 % $FeCl_3$, 3 N HCl und 12 % TCA, abgestoppt. Denaturiertes Protein wurde durch 3 min Zentrifugation bei 4 000 upm entfernt und der Farbkomplex des Überstandes bei 540 nm in d = 1 cm Küvetten gemessen. Eine Eichkurve wurde mit synthetischem Acetylphosphat, Hydroxylamin und dem $FeCl_3$-Reagenz im Bereich von 0 - 2,5 µM aufgenommen. Als eine Enzymeinheit wurde die Menge Flavodoxin bzw. Ferredoxin definiert, die unter diesen Bedingungen die Bildung von 1 µM Acetylhydroxamat katalysiert.

2.29. Manometrische Messungen

Die manometrischen Enzymmessungen erfolgten in einer Rund-Warburg-Apparatur (Firma Braun, Melsungen) bei 30° C und einer Schüttelfrequenz von 100/min (Amplitude = 4 cm) nach den von UMBREIT et al. (1964) beschriebenen Methoden. Die Gasmessungen wurden in zweiarmigen 15 ml Warburggefäßen durchgeführt. Das Beschicken der Reaktionsgefäße erfolgte unter ständigem Wasserstoffstrom (Sauerstoff-frei) der über den freien Arm der Gefäße geleitet wurde. Danach wurden die Gefäße rasch mit den

Manometern verbunden, mit Wasserstoff je nach Versuchsanordnung 5 - 15 min begast und weitere 10 - 25 min bis zur Druckkonstanz äquilibriert. Anschließend wurden die Nullwerte des Thermobarometers und der Testmanometer abgelesen und die Reaktion durch Kippen der Seitenarminhalte in den Hauptraum gestartet.

2.29.1. Hydrogenase: Wasserstoffaufnahme zellfreier Extrakte
(FREDRICKS und STADTMAN, 1965)

Zur Messung der Ferredoxin- und Flavodoxinabhängigkeit der Hydrogenase wurde folgendes Testprinzip gewählt:

$$H_2 + NAD^+ \xrightarrow{\text{Hydrogenase, Fd/Fld}} NADH + H^+$$

$$NADH + H^+ + \text{Pyruvat} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + NAD^+$$

Diese empfindliche Methode erlaubte eine kontinuierliche und lange Zeit lineare Reaktionsmessung.

Puffer:	A)	10 mM	KPO_4, pH 7,5
		10 mM	Glutathion (red.)
		0,03 %	$Na_2S \cdot 9\ H_2O$
	B)	200 mM	Tris-HCl-Puffer, pH 7,8

Beide Komponenten wurden im Verhältnis 1 : 1 (v/v) gemischt und 10 min mit Wasserstoff äquilibriert. In 15 ml diesen Puffers wurden 5 g gefrorene Normal-Eisen- und Eisenmangel-Zellen in Gegenwart von Lysozym aufgetaut und ein bestimmtes Volumen nach French-Aufschluß und Zentrifugation mit Hilfe von DEAE-Cellulose von Ferredoxin bzw. Flavodoxin befreit.

Hauptraum:	0,5 M Tris-HCl, pH 7,8	0,12 ml
	0,1 M Glutathion (red.)	0,2 ml
	Ferredoxin oder Flavodoxin (0,18 mM)	0 - 0,2 ml
	Extrakt	0,5 ml
	H_2O dest.	0 - 0,2 ml
Seitenarm:	LDH (78 Einheiten/ml)	0,1 ml
	50 mM NAD	0,1 ml
	0,2 M Pyruvat	0,1 ml
Zentralgefäß:	20 % KOH	0,2 ml
Totalvolumen:	1,52 ml	

Die Rate der Wasserstoff-Aufnahme war unter diesen Bedingungen für etwa 1 Stunde konstant.

2.29.1.1. Herstellung eines hitzestabilen Cofaktors (boiled extract) (KORKES, 1955)

Ein Gramm Fe(+)- oder Fe(-)-Trockenzellen von C. kluyveri wurden in 20 ml bidest. Wasser von 100° C suspendiert und diese Lösung 10 min in kochendem Wasser inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf Zimmertemperatur abgekühlt und 15 min bei 17 000 upm und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand (boiled extract) wurde bei -20° C aufbewahrt.

2.29.2. NAD-Ferredoxin-Reduktase (Wasserstoff als Gasphase)

In 25 ml 100 mM KPO_4-Puffer, pH 7,5 wurden 10 g gefrorene Zellen in Gegenwart von 20 mM MET und Lysozym aufgetaut und der zellfreie Extrakt mittels DEAE-Cellulose von Ferredoxin und Flavodoxin befreit.

Hauptraum:	0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,5	2,0 ml
	Extrakt	0,5 ml
	Ferredoxin oder	
	Flavodoxin (0,18 mM)	0,0 - 0,2 ml
	H_2O dest.	0,07 - 0,27 ml
Seitenarm I:	0,2 M α-Ketoglutarat	0,2 ml
	Glutamat-Dehydrogenase (4 mg/ml)	0,01 ml
Seitenarm II:	1 M Ammoniumacetat	0,02 ml
	15 mM NAD	0,3 ml
Totalvolumen:	3,3 ml	

α-Ketoglutarat, Glutamat-Dehydrogenase und Ammoniumacetat dienten der Regenerierung von NAD.

2.29.3. NADP-Ferredoxin-Reduktase (Wasserstoff als Gasphase)

Hauptraum:	0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,5	2,0 ml
	Extrakt	0,5 ml
	Ferredoxin oder	
	Flavodoxin (0,18 mM)	0 - 0,2 ml
	H_2O dest.	0,08 - 0,28 ml
Seitenarm I:	15 mM NADP	0,3 ml
Seitenarm II:	Glutathion (ox. 50 mg/ml)	0,2 ml
	Glutathion-Reduktase (1 mg/ml)	0,02 ml
Totalvolumen:	3,3 ml	

Der Zusatz von oxidiertem Glutathion und Glutathion-Reduktase diente der Regenerierung von NADP.

2.30. Bestimmung von Radioaktivität

Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer Tri-Carb, Mod. 3375 (Firma Packard, Frankfurt/M.) durchgeführt. Die Aktivität von ^{14}C-Verbindungen wurde in einem gebrauchsfertigen Szintillationscocktail bestimmt (Insta-Gel, Firma Packard, Frankfurt/M.)

2.31. Pyruvat-Synthase (GOTTSCHALK und CHOWDHURY, 1969)

Die Pyruvatsynthese aus Acetylphosphat, Coenzym A und CO_2 durch zellfreie Extrakte von C. kluyveri wurde in Warburg-Gefäßen bei 30° C unter einer Wasserstoffatmosphäre durchgeführt.

Hauptraum:	KPO_4-Puffer, pH 7,0	50 mM
	MET	25 mM
	Acetylphosphat	25 mM
	Coenzym A	0,5 mM
	$NADH_2$	2,5 mM
	LDH (550 Einheiten/mg)	100 µg
Seitenarm I:	Ferredoxin-/Flavodoxin-freier Extrakt	0,4 ml
Seitenarm II:	Ferredoxin/Flavodoxin (0,18 mM)	0 - 0,1 ml
	$KH^{14}CO_3$ (281.200 cpm/µMol)	10 mM
Totalvolumen:	2,00 ml	

Die Gefäße wurden 10 min mit H_2 begast. Nach einer Präinkubationszeit von 20 min wurden die Inhalte der Seitenarme in den Hauptraum gekippt und die Reaktion nach weiteren 20 min mit 0,1 ml 70 %iger Perchlorsäure abgestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde aus den Gefäßen quantitativ in Reagenzgläser überführt und das denaturierte Protein durch 5 min Zentrifugation bei 4 000 upm sedimentiert. Der Überstand wurde zur Vertreibung flüchtiger Anteile 5 min mit einem Luftstrom äquilibriert und danach 0,8 ml in einen Meßbehälter mit 10 ml Unisolv-Lösung versetzt. Das in nichtflüchtige Anteile inkorporierte $^{14}CO_2$ wurde im Packard Tri-Carb Flüssigkeits-szintillations-Spektrometer bestimmt.

Chemikalien und Enzyme

Es wurden handelsübliche p.a. Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt) und J. T. Baker (Holland) verwendet. Die speziellen Chemikalien und Biochemikalien hatten folgende Herkunft: Firma Whatman, Balston Ltd. (England): DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher DE 52. Firma Pharmacia (Uppsala): Sephadex G-75. Firma Radiochemical Centre, Amersham via Firma Buchler (Braunschweig): $KH^{14}CO_3$ (>50 mCi/mMol). Firma Serva (Heidelberg): Acrylamid, Bis, TEMED, Ammoniumpersulfat, Coomassie-Brillant Blue R 250, DTNB, Dowex Chelating Resin A-1, Riboflavin, Na-Dodecylsulfat. Firma Boehringer & Söhne (Mannheim): NAD, NADP, Coenzym A, Lactat-Dehydrogenase, Eichproteine, FMN, FAD, Glutathion, α-Ketoglutarat, Glutamat-Dehydrogenase, Glutathion-Reduktase, Lysozym, Desoxyribonuklease. Firma Merck (Darmstadt): Bathophenanthrolindisulfonsäure, p-Dimethylaminobenzaldehyd. Firma Difco, Detroit (Michigan) via Otto Nordwald KG (Hamburg): Na-Thioglycolat. Firma Riedel-De Haen (Hannover): Eisenstandard-Lösung. Firma Bio-Rad Laboratories, Richmond (USA): Bio Gel P-60.

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1. Gärungsbilanzen von Normal-Eisen- und Eisenmangel-Kulturen

3.1.1. Abhängigkeit des Gärungsverlaufs von der Eisenkonzentration

Die wachstumsphysiologischen Untersuchungen an C. kluyveri hatten gezeigt, daß die Eisenkonzentration des Mediums die Wachstumsparameter und molaren Ertragskoeffizienten (Y_m; Y_{ATP}) stark beeinflußten (SCHWAN, 1972). Unter Eisenmangel-Bedingungen nahmen Zelldichte, Zellerträge und Mengen des umgesetzten Substrats signifikant ab. Gleichzeitig war jedoch eine generelle Steigerung der Flavinproduktion mit fortschreitender Verringerung der Eisenkonzentration zu beobachten. Physiologische Erwägungen ließen aus der Wachstumstypologie die Existenz eines eisenfreien Elektronencarriers vermuten, der Ferredoxin in seinen Funktionen ersetzte. In der, auf die Isolierung eines neuen Proteins ausgerichteten Weiterführung der Experimente,konnte Flavodoxin in C. kluyveri nachgewiesen werden.

Zur exakten physiologischen und biochemischen Charakterisierung des nur in relativ geringer Quantität in der Zelle vorliegenden Elektronentransportproteins mußte zunächst eine optimale Eisen-(Mangel)-Konzentration ermittelt werden. Diese mußte eine technische Anwendbarkeit der Flavodoxin-Anreicherung gestatten und zwangsläufig einen Kompromiß verschiedener Faktoren beinhalten. Der nur durch Eisenmangel zu erreichenden Steigerung der Flavin-Flavodoxin-Produktion stand eine äußerst geringe Zellausbeute gegenüber. Ein zu hoher Eisengehalt wiederum hätte höhere Zellerträge ergeben, gleichzeitig aber auch eine alleinige Ferredoxin- bzw. synchrone Ferredoxin-Flavodoxin-Synthese gestattet. Versuche zur Ermittlung von optimalen Wachstumsbedingungen für die Flavodoxingewinnung werden im folgenden beschrieben.

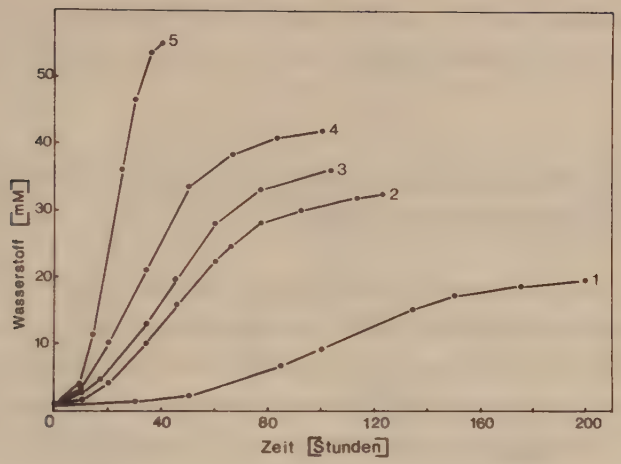


Abb. 3 Verlauf der Wasserstoff-Bildung während der Äthanol-Acetat-Gärung in Gegenwart verschiedener Eisenkonzentrationen

Die Gasmessungen erfolgten in der unter 2.9. beschriebenen Apparatur nach Absorption des CO_2. Die Nährlösungen (1) - (4) wurden mit Dowex Chelating Resin A-1 (Serva, Heidelberg) von Eisenkontaminationen der Nährsalze befreit und anschließend die angegebene Menge Fe zugesetzt. Kurve (1) = 16 ng Fe/ml; (2) = 41 ng Fe/ml; (3) = 66 ng Fe/ml; (4) = 116 ng Fe/ml; (5) = 4 µg Fe/ml (regulärer Eisengehalt).

Die in Abb. 3 verwendeten Eisenkonzentrationen der Kurven (1) - (3) schienen aufgrund der geringen Zellerträge und bis zu 500 % längeren Wachstumszeiten zur Massenanzucht nicht geeignet. Der Verlauf der Kurve (4) entsprach exakt dem einer Dowex-unbehandelten Kultur ohne Zusatz von Eisen. Eine nach CAMPBELL (1972) durchgeführte Fe-Bestimmung mit 10- und 20fach konzentrierten Proben ergab einen Eisengehalt von etwa 0,1 µg Fe/ml. Die in Kurve (4) verwendete Konzentration lag bei 0,116 µg Fe/ml. Dies bedeutete bereits einen um den Faktor 40 geringeren Eisengehalt gegenüber der regulären Nährlösung. Da bei dieser Konzentration ein Entfernen des Eisens aus den Nährlösungskomponenten entfiel und die Zellerträge von 350 -

500 mg Naßgewicht/l noch in einer nutzbaren Größe lagen, wurden während dieser Arbeit reguläre Nährlösungen, aber ohne Zusatz von Eisen verwendet.

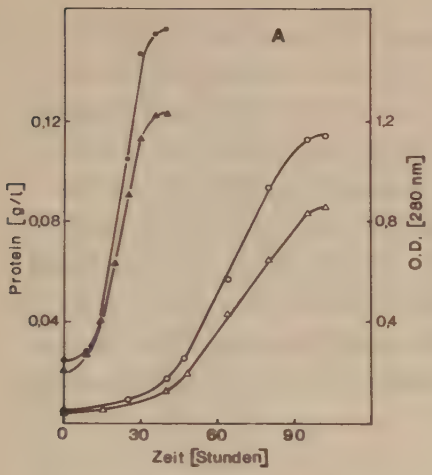
Verlauf der Äthanol-Acetat-Gärung von Normal-Eisen- und Eisenmangel-Kulturen. Analyse der Gärungsprodukte.

In Abb. 4 ist der Gärungsverlauf einer normalen Kultur (4 µg Fe/ml) dem Eisenmangelwachstum (0,1 µg Fe/ml) gegenübergestellt. Die Untersuchung der Äthanol-Acetat-Gärung erfolgte in der unter 2.9. beschriebenen Apparatur. Mit sterilem Medium gefüllte 500 ml-Kulturgefäße wurden 16 %ig beimpft und nach Entnahme einer Nullprobe an die Gärapparatur angeschlossen. Zu definierten Zeiten erfolgte die Probennahme mittels N_2-Druck und die Wasserstoffmessung. Die ermittelten Wasserstoffwerte wurden nach Temperatur- und Druckkorrektur (Normalbedingungen) auf mMole H_2 je l Nährlösung umgerechnet. Die Proben wurden in bestimmte Volumina aufgeteilt, ein Aliquot zur Proteinbestimmung entnommen und die Überstände nach erfolgter Zentrifugation eingefroren. Äthanol und Acetat wurden enzymatisch bestimmt (siehe 2.10. und 2.11.), die Analyse der Gärungsprodukte erfolgte gaschromatographisch nach der Arbeitsanleitung des Anaerobe Laboratory Manual, 1972. Die Trockengewichtsbestimmung (siehe 2.6.) wurde nach STOUTHAMER (1969) durchgeführt, Protein ganzer Zellen nach SCHMIDT et al. (1963) bestimmt.

Abb. 4 Gärungsverlauf einer regulären und einer Eisenmangel-Kultur

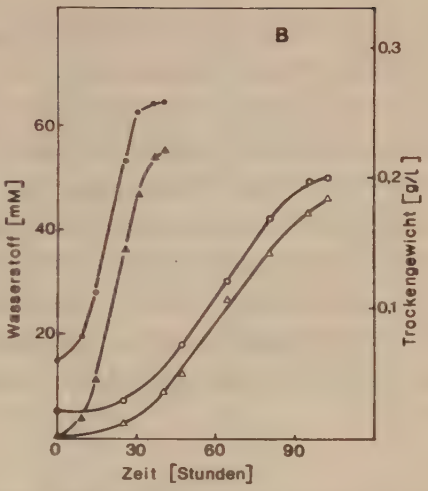
offene Symbole Fe(-)-Zellen; geschlossene Symbole Fe(+)-Zellen

Die Experimente wurden wie unter "Methoden" beschrieben durchgeführt. Die Abbildungen geben gemittelte Meßwerte aus 4 Testreihen wieder.



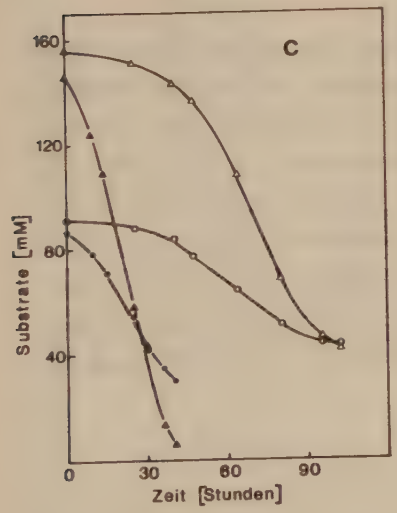
A) Zunahme der optischen Dichte und des Proteingehaltes

○ Protein; △ O. D.



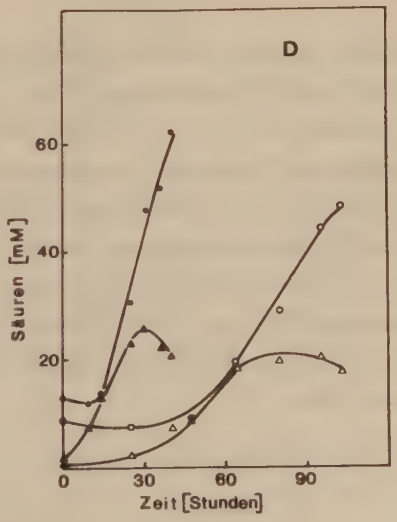
B) Wasserstoffentwicklung und Trokkengewichtszunahme

○ Trockengewicht; △ Wasserstoff



C) Äthanol- und Acetat-Verbrauch

○ Acetat; △ Äthanol



D) Bildung von Butyrat und Caproat

○ Capronsäure; △ Buttersäure

Die Werte der Wachstumsparameter liefen jeweils synchron zum Substratverbrauch. Wie aus dem Gärverlauf zu ersehen war, ergaben gaschromatographische Analysen keinerlei Hinweise auf die Synthese anderer Gärprodukte. Eine qualitative Änderung der Gärprodukte war neben der quantitativen Verschiebung nicht zu beobachten. Die in Abb. 4 (D) skizzierte Buttersäuresynthese nahm parallel zum logarithmischen Wachstum zu. Nach Erreichen der stationären Phase stagnierte die Butyratkonzentration jedoch nicht, sondern sank wieder ab. Die Capronsäuresynthese dagegen stieg weiter an. Dies bedeutete, daß nach Beendigung des Wachstums und in Gegenwart von Äthanol eine Synthese von Caproat aus Äthanol und Butyrat erfolgte.

Die in Abb. 4 ermittelten Ergebnisse wurden zur besseren Übersicht tabellarisch zusammengefaßt und gegenübergestellt. Der Eisengehalt der Mangelkultur betrug 2,5 % der Normalkultur, die Wachstumszeit der Mangelkultur lag um 260 % höher.

Vergleicht man die prozentuale Abweichung des Gesamt-Substratverbrauchs und der Gesamt-Produktbildung (Tab. 2), so ergibt sich ein Minderverbrauch der Mangelkultur von 17 - 19 %. Die Gesamt-Produktbildung, unter Berücksichtigung der Flüchtigkeit der gebildeten Fettsäuren, lag um 15 - 20 % niedriger als die der normalen Kultur. Diese, in der Total-Bilanz nicht wesentlich hervortretenden Reaktionen auf einen suboptimalen Eisengehalt werden erst unter Einbeziehung der Wachstumszeit deutlich. Bei Umrechnung des Substratumsatzes und der Produktbildung pro Stunde erreichten die Absolutwerte der Abbau- und Synthese-Aktivität nur 31 - 34 % der Werte der regulären Kultur.

Tab. 2 Substratverbrauch und Produktbildung der Äthanol-Acetat-Gärung

Substrat oder Produkt	Substratverbrauch und Produktbildung							
	Gesamt				Pro Stunde			
	Fe(+)		Fe(-)		Fe(+)		Fe(-)	
	mMol/l	%	mMol/l	%	mMol/l	%	mMol/l	%
Äthanol	140	100	114	81	3,5	100	1,14	32
Acetat	56,6	100	47	83	1,41	100	0,46	33
Butyrat	23,6	100	19,2	81	0,78	100	0,24	31
Caproat	49,2	100	39,2	80	1,23	100	0,38	31
H_2	55,1	100	47	85	1,38	100	0,47	34
	g/l	%	g/l	%	g/l . h	%	g/l . h	%
Protein	0,157	100	0,115	80	0,0039	100	0,0012	31
Trockenmasse	0,258	100	0,201	78	0,0065	100	0,002	30

Symbole: Fe(+) = regulärer Eisengehalt

Fe(-) = Eisenmangel

Tab. 3 Einfluß von Eisen auf die C-Bilanz der Äthanol-Acetat-Gärung

Substrate oder Produkte	Umgesetzte Mengen			
	Fe(+)		Fe(-)	
	mMol/100 mMol Äthanol	%	mMol/100 mMol Äthanol	%
Äthanol	-100	100	-100	100
Acetat	- 40,4	100	- 41,2	102
Butyrat	+ 16,85	100	+ 16,84	100
Caproat	+ 35,1	100	+ 34,4	98
H_2	+ 39,3	100	+ 41,2	104
H_2/Äthanol	0,39	100	0,41	105
C-Bilanz	99 %	100	97 %	98

Fe(+) = Normal-Eisen; Fe(-) = Eisen-Mangel

Die Tabelle gibt die umgesetzten Substrat- und Produktmengen je 100 mMol verbrauchten Äthanols und die daraus erkennbare C-Bilanz wieder. Die Bilanzen in Gegenwart von Eisen und bei Eisenmangel zeichneten sich durch nahezu völlige Übereinstimmung aus. Ein Einfluß auf die relative Zu- oder Abnahme von Substratverbrauch oder Produktbildung schied bei dieser Eisenkonzentration aus.

3.1.2. Einfluß von Molybdän auf den Stoffwechsel von C. kluyveri

Der Nährlösung zur Anzucht von C. kluyveri wird stets Molybdän zugegeben (BORNSTEIN und BARKER, 1948; STADTMAN und BURTON, 1955).

Die Mo-bedürftigen bekannten Enzymkomplexe wie Xanthin-Oxidase (SMITH et al., 1967), Nitrat-Reduktase (NICHOLAS und NASON, 1954), Xanthin-Dehydrogenase (BRADSHAW und BARKER, 1960), Nitrogenase (MORTENSON et al., 1967), CO_2-Reduktase (THAUER et al., 1973) und Formiat-Dehydrogenase (ANDREESEN et al., 1974; ANDREESEN und LJUNGDAHL, 1973) sind bei C. kluyveri nicht nachgewiesen worden und dort ohne Bedeutung.

JOHNSTONE und FISHBEIN beschrieben 1956 ein gelbes Pigment, das bei Azotobacter agile und A. vinelandii im Eisenmangel durch Zugabe von Molybdän induziert wurde. DERVARTANIAN und BRAMLETT (1970) fanden bei A. vinelandii (Flavodoxin-Produzent), daß eisenbedürftige Enzyme (NADH-Dehydrogenasen) im Eisenmangel Molybdän statt Eisen einbauten und gleiche Aktivität zeigten. Diese Ergebnisse regten dazu an, den Einfluß von Molybdän auf die Gärung von C. kluyveri unter Eisenmangelbedingungen zu untersuchen.

Der Verlauf der Äthanol-Acetat-Gärung wurde, wie in 2.9. beschrieben, mit 500 ml-Kulturen folgender Kombination durchgeführt:

A) Mit Eisen, mit Molybdän
B) Mit Eisen, ohne Molybdän
C) Ohne Eisen, mit Molybdän
D) Ohne Eisen, ohne Molybdän

Die Molybdän-Adaption war durch 12maliges Überimpfen vor Versuchsbeginn sichergestellt. Bei jeweils gleichem Eisengehalt zeigten Kulturen, die mit Mo versetzt waren, absolute Übereinstimmung mit Mo-freien Kulturen in Äthanol- und Acetatverbrauch, Fettsäurebildung und Wasserstoffproduktion. Protein, Trockengewicht und O. D. zeigten ebenfalls keine abweichende Tendenz.

Die in 3.1.1. angegebenen Abbildungen und Meßwerte waren völlig identisch mit der Molybdän-Testreihe. Die bei Azotobacter durch Molybdän und Eisenmangel induzierten gelben Pigmente konnten bei C. kluyveri nicht beobachtet werden. Der Flavingehalt (siehe 3.1.4.) der Zellen war in Mo-freien und Mo-haltigen Kulturen ebenfalls absolut kongruent.

Diese Ergebnisse ließen den bereits vorher vermuteten Schluß zu, daß Molybdän bei C. kluyveri unter diesen Wachstumsbedingungen keinerlei erkennbare Funktion im anabolischen oder katabolischen Stoffwechsel hatte. Die gesamten Zellanzuchten und physiologischen Zelluntersuchungen wurden daher stets in Mo-freier Nährlösung durchgeführt.

3.1.3. Massenkultur und Fermenteranzucht

Die Anreicherung eines Elektronentransportproteins erforderte wegen der geringen Zellausbeute die Massenanzucht in Groß-Fermentern. Die 185 l- und 365 l-Fermenter der AG für Biologische Verfahrenstechnik (Basel) ermöglichten eine anaerobe Fe-freie Anzucht unter sterilen Bedingungen (genaue Beschreibung siehe 2.2.4.).

C. kluyveri zeigte eine stark ausgeprägte Tendenz, nach dem Übergang zum stationären Wachstum lytischer Zersetzung zu unterliegen. Die Zellen wurden daher in der späten log-Phase (70 - 80 Stunden) geerntet, mit Hilfe eines Separators konzentriert und nach Zentrifugation sofort gefriergetrocknet. Das Zellmaterial wurde anschließend unter Wasserstoff bei -20° C bis zum späteren Gebrauch aufbewahrt. Die lyophilisierten Zellen erwiesen sich nach Lagerung bis zu 3 Monaten als völlig stabil; eine wesentlich längere Lagerung schien daher ohne Aktivitätsverluste möglich zu sein.

Da bei der großtechnischen Anaeroben-Anzucht eine Kumulation wachstumslimitierender Faktoren eintrat (z. B. Scherkräfte beim Umwälzvorgang, Überdruck, unempfindlich zu steuernde Temperaturregelung mittels einer

Dampfanlage, Fe-Mangel), mußten erhebliche Einbußen bei der Ausbeute hingenommen werden. Die unter optimalen Bedingungen erreichbaren Ausbeuten eines Wachstumsversuches im Labormaßstab konnten nicht ohne weiteres auf die Massenanzucht übertragen werden. Die durchschnittlichen Zellausbeuten lagen weit unter denen anderer Bakterien.

Tab. 4 Zellausbeuten einiger im hiesigen Institut verwendeten Bakterien

Organismus		Ausbeute (g Naßgewicht/l)
C. kluyveri (Fe-Mangel)	anaerob	0,3 - 0,4
C. kluyveri (Fe-Normal)	"	1 - 1,2
C. citricovorans	"	1,2 - 1,5
C. formicoaceticum	"	4,0 - 4,5
C. pasteurianum	"	6,0 - 7,0
C. thermoaceticum	"	10 - 12
Hydrogenomonas eutropha	aerob	20 - 22

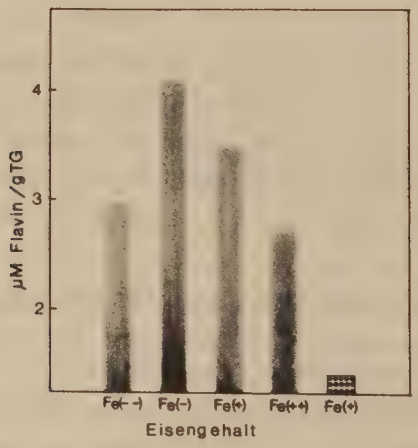
Tab. 4 zeigt, wie gering die Ausbeuten von C. kluyveri schon in Normalkulturen im Vergleich zu anderen anaeroben und aeroben Bakterienarten waren. Bei Eisenmangel sank sie noch einmal auf ein Drittel. So wird deutlich, daß die Anfangsschwerpunkte dieser Arbeit der Zellanzucht zugewandt waren und daß die Zellausbeuten (1,5 % gegenüber H. eutropha; 3 % gegenüber C. thermoaceticum) an der Grenze der sinnvollen Nutzbarkeit lagen.

3.1.4. Abhängigkeit des Flavingehaltes von der Eisenkonzentration

Untersuchungen an Clostridium acetobutylicum (RODGERS et al., 1946) und Candida guilliermondii (ENARI, 1958) ergaben, daß unter Eisenmangelbedingungen die Synthese von Riboflavin stimuliert wurde, daß jedoch unterhalb eines bestimmten Levels die Flavinproduktion wieder abnahm (HICKEY,

1945).

Flavine (Isoalloxazinderivate) besitzen neben ihrer charakteristischen gelben Farbe, die aus der starken Absorption im violetten und blauen Spektralbereich resultiert, wie ihre Photolyse-Produkte (Lumichrom, Lumiflavin) gelbgrüne Fluoreszenz. Diese Eigenschaften macht man sich, zusammen mit ihrer guten Wasserlöslichkeit, bei der spektrophotometrischen und fluorometrischen Bestimmung zunutze. Da bei C. kluyveri ein hoher Flavingehalt bekannt war (PEEL, 1958), konnte auf die etwas weniger empfindliche photometrische Messung zurückgegriffen werden. C. kluyveri wurde ohne und in Gegenwart von Molybdän bei verschiedenen Eisenkonzentrationen angezogen und mit den lyophilisierten Zellen die in 2.24. beschriebene Total-Flavin-Bestimmung durchgeführt (YAGI, 1962). Die Extinktionskoeffizienten (450 nm) für Riboflavin (RF) und FMN sind identisch, nicht aber für FAD. Da sich der Flavingehalt bei C. kluyveri aus RF, FMN und FAD zusammensetzt (2 : 25 : 73, PEEL, 1958), mußte FAD durch Zugabe von TCA und 12stündiger Inkubation im Dunkeln bei 37° C zu FMN hydrolysiert werden.



In Abb. 5 wurde der Einfluß von Eisen auf die Flavinbildung von C. kluyveri- und C. pasteurianum-Zellen dargestellt. Es wurde deutlich, daß sowohl Eisenüberschuß (Fe ++) als auch starker Eisenmangel (Fe--) negativen Einfluß auf die Produktion von Flavinen ausübten, während ein begrenzter Eisenmangel (Fe-) eine optimale Flavinsynthese ermöglichte. Die erhöhte Flavinproduktion gegenüber Normalzellen hing wahrscheinlich mit der Neusynthese oder Umstrukturierung von Flavoproteinen unter Fe-Mangel zusammen. Die bei weiter sinkendem Eisengehalt ebenfalls abnehmende Flavinproduktion beruhte auf der - wenn auch geringen - Eisenbedürftigkeit der Flavin-synthetisierenden Enzyme.

Der Flavingehalt von regulär gewachsenen C. pasteurianum-Zellen betrug nur 39 % der C. kluyveri-Zellen. Diese Sonderstellung von C. kluyveri wird durch die von PEEL (1958), ermittelten Flavingehalte einer Reihe von Bakterien noch verdeutlicht.

Abb. 5 Einfluß von Eisen auf den Flavingehalt

Symbole: Fe(--) = 0,016 µg Fe/ml
Fe(-) = 0,1 µg Fe/ml
Fe(+) = 4 µg Fe/ml
Fe(++) = 12 µg Fe/ml
▨ = C. kluyveri
▩ = C. pasteurianum

Die Methode wurde unter 2.24. beschrieben.

Tab. 5 Flavingehalt von C. kluyveri, C. pasteurianum und einigen Flavodoxin-produzierenden Organismen

Organismus	Fe-Gehalt	µMole Flavin/g TG	
C. kluyveri	(-)	4,10	
C. kluyveri	(+)	3,66	
C. kluyveri	(+)	2,93	PEEL, 1958
Rumenorganism Elsden	(+)	1,48	PEEL, 1958
C. pasteurianum	(+)	1,44	
E. coli	(+)	0,24	PEEL, 1958
Azotobacter agile	(+)	0,12	"
Desulfovibrio desulfuricans	(+)	0,11	"
R. rubrum	(+)	0,03	"

Fe-Gehalt: Fe(-) = Eisenmangel; Fe(+) = Normaler Gehalt. Für die Anzucht von C. kluyveri und C. pasteurianum gelten die für Abb. 5 angegebenen Daten und Flavin-Bestimmungsmethoden. PEEL (1958) untersuchte 23 Organismen auf ihren Flavingehalt mit Papier-elektrophoretischen Methoden, ein Auszug ist in obiger Tabelle wiedergegeben.

Von den 23 von PEEL untersuchten Organismen hatte C. kluyveri den weitaus höchsten Flavingehalt, den niedrigsten, noch elektrophoretisch erfaßbaren Gehalt hatte Rhodospirillum rubrum. Der von PEEL gefundene, etwas niedrigere Wert für C. kluyveri kann durch die Verwendung eines anderen Nährmediums erklärt werden. Aus der vergleichenden Untersuchung ging hervor, daß hoher Flavingehalt überwiegend bei Fettsäure-produzierenden Organismen auftrat und die "Flavine" im Metabolismus der Buttersäure-Produktion assoziiert waren. Die Flavinbestimmungen ließen erkennen, daß generell keinerlei direkter Zusammenhang zwischen dem Flavingehalt und der Fähigkeit zur Flavodoxin-Synthese bestand: Flavodoxin-Bil-

dung trat bei Bakterien von 30 - 4 100 nMolen Flavin/g Trockengewicht auf.

3.2. Anreicherung von Flavodoxin aus Clostridium kluyveri

3.2.1. Methoden zur Flavodoxin- und Ferredoxinbestimmung

Da Ferredoxin und Flavodoxin lediglich Elektronen-Transport-Funktion haben, konnte die Aktivität dieser Carrier nur indirekt mit Hilfe eines ferredoxinbedürftigen Enzymsystems verfolgt werden. Als physiologisch identische Elektronentransport-Proteine katalysieren in C. kluyveri sowohl Ferredoxin als auch Flavodoxin die Entwicklung von molekularem Wasserstoff (Hydrogenase, NAD(P)-Fd-Reduktase) und die reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA (Pyruvat-Synthase) zu Pyruvat. Bei jeder dieser Reaktionen konnte Ferredoxin sowohl in vitro als auch in vivo von Flavodoxin ersetzt werden.

Ferredoxin stimulierte ebenfalls die Oxidation von Pyruvat zu Acetylphosphat (Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase). Die Aktivität als Elektronencarrier betrug im Pyruvat-Oxidations-System von C. kluyveri jedoch nur 5 % der Aktivität eines C. pasteurianum-Systems (STERN, 1965). Da auch andere Faktoren die Pyruvat-Oxidation in C. kluyveri-Extrakten aktivierten, schloß STERN auf einen unspezifischen Effekt von Ferredoxin in diesem Enzymsystem.

Zur gebräuchlichen Aktivitätskontrolle des Ferredoxins und Flavodoxins während der Anreicherung wurde daher ein Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Präparat aus C. pasteurianum-Zellen verwendet.

Bestimmung mit Hilfe der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase katalysiert zusammen mit der Hydrogenase und der Phosphotransacetylase (PTA) unter Beteiligung von Fer-

redoxin (Flavodoxin) die Oxidation von Pyruvat zu Acetylphosphat, H_2 und CO_2. Das gebildete Acetylphosphat wurde als Eisenhydroxamat nach der Methode von LIPMAN und TUTTLE (1945) gemessen (siehe 2.28.). Als eine Einheit (U) Flavodoxin oder Ferredoxin wurde die Menge definiert, die die Bildung von 1 µMol Acetyl-Hydroxamat unter diesen Bedingungen katalysierte. Das Enzymsystem wurde durch Adsorption eines C. pasteurianum-Rohextraktes an DEAE-Cellulose erhalten. Der Carrier-freie Extrakt katalysierte die Pyruvatspaltung nur nach Zugabe von Ferredoxin oder Flavodoxin. Diese Methode führte jedoch, wegen der Labilität und impraktikablen Standardisierung des phosphoroklastischen Enzymsystems, zu variablen Resultaten. Die Carrier-freien Enzympräparate konnten auch als Lyophilisat nur unter großen Aktivitätsverlusten gelagert werden. Zum anderen war der molare Extinktionskoeffizient des als Produkt gemessenen Acetylhydroxamates niedrig (170 x $M^{-1}cm^{-1}$; LOVENBERG et al., 1963) und bedingte so eine geringe Empfindlichkeit.

Zusätzlich wurde die Schutzwirkung der folgenden SH-Reagenzien auf die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase untersucht: Mercaptoäthanol, reduziertes Glutathion (GSH) und ein Glutathion-Natriumsulfid-Gemisch (GSH-Na_2S). Als effektivste Verbindung erwies sich das Glutathion-Sulfid-Gemisch, während das üblicherweise verwendete Mercaptoäthanol nur ausreichende stimulierende Wirkung zeigte.

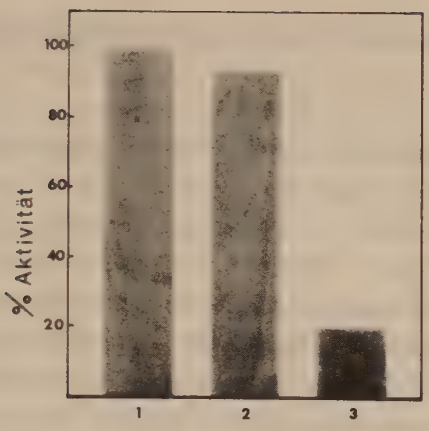


Abb. 6 Flavodoxin-Aktivität der Pyruvat-Fd-Oxidoreduktase-Reaktion in Abhängigkeit verschiedener SH-Reagenzien

Die Reaktionsgemische waren wie unter 2.28. beschrieben zusammengesetzt. Die spez. Aktivität von Flavodoxin in der phosphoroklastischen Reaktion betrug mit 10 mM GSH + 1,2 mM Na_2S (1) = 21,8 U/mg Protein (100 %); mit 10 mM GSH (2) = 20,4 U/mg Protein (94 %) und mit 20 mM Mercaptoäthanol (3) = 4,4 U/mg Protein (21 %).

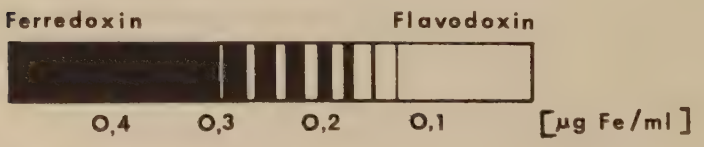
Hydrogenase aus C. kluyveri

Der Flavodoxin-Test, bei dem die Wasserstoffaufnahme als Meßgröße verfolgt wurde, erbrachte ungleich höhere Aktivitätswerte. Die manometrische Messung erfolgte in einer Warburg-Apparatur mit Ferredoxin- oder Flavodoxin-freien nicht-dialysierten Hydrogenasepräparaten (siehe 2.29.1.). Die bei der Hydrogenase-Reaktion gemessene spezifische Aktivität betrug bei Flavodoxin 270 U/mg Protein. Die Aktivität in der phosphoroklastischen Pyruvatspaltung betrug nur 8 % der Hydrogenaseaktivität.

3.2.2. Regulativer Einfluß der Eisenkonzentration auf die Flavodoxin-Synthese

Ferredoxin und Flavodoxin katalysieren im Organismus die gleichen Stoffwechselreaktionen. Zudem zeigten beide Proteine aufgrund ihres hohen Gehaltes an sauren Aminosäuren eine ausgeprägte Affinität zu DEAE-Cellulose und somit nahezu übereinstimmende Elutionseigenschaften. Deshalb war die quantitative Bestimmung beider Carrier nebeneinander sehr schwierig, zumal auch spektrophotometrische Analysen infolge der Anwesenheit anderer Flavine nicht möglich waren. Aus diesem Grunde wurde darauf verzichtet, die genaue Eisenkonzentration zu ermitteln, bei der die Ferredoxin-Produktion bereits unterbunden war und die Flavodoxin-Synthese begann.

Die Elektronencarrier wurden in Zellen, die in Gegenwart verschiedener Eisenkonzentrationen kultiviert waren, bis zur jeweiligen eindeutigen Identifizierung gereinigt, die Aktivität in der phosphoroklastischen Pyruvatspaltung ermittelt und Absorptionsspektren aufgenommen. Ferredoxin war in Zellen, die in Gegenwart von $>0{,}4$ µg Fe/ml angezogen worden waren, die einzige Elektronencarrier-Komponente. Unterhalb eines Eisengehaltes von 0,1 µg Fe/ml konnte nur Flavodoxin nachgewiesen werden. Die Limitierung von Eisen beantwortete die Zelle mit der sequentiellen Abnahme von Ferredoxin und gleichzeitiger Zunahme von Flavodoxin im Konzentrationsbereich von 0,3 - 0,15 µg Fe/ml.

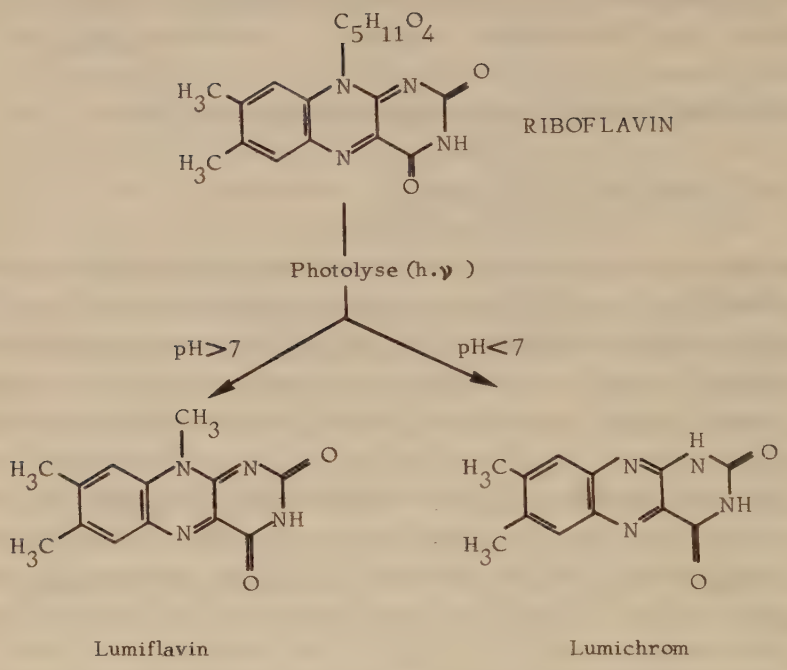


Dieser, die Flavodoxin-Synthese auslösende Konzentrationsbereich des Eisens, lag bei Rhodospirillum rubrum und C. pasteurianum als Zeichen eines größeren Eisenbedarfes etwas höher: 0,35 - 0,42 µg Fe/ml (CUSANOVICH und EDMONDSON, 1971; KNIGHT und HARDY, 1966).

3.2.3. Anreicherung von Flavodoxin

Bei der Anreicherung dieses Elektronentransport-Proteins wurde, wie bei Verfahren zur Gewinnung von Flavodoxin aus anderen Bakterien, die ausgeprägte Affinität zu DEAE-Cellulose und das niedrige Molekulargewicht des Flavodoxins genutzt. Bei der Anreicherungsmethode wurden diese Charakteristika alternierend angewandt und durch nachfolgende mehrfache Ammoniumsulfat-Fraktionierung ein absolut homogenes Flavodoxin-Präparat erhalten. Die Anreicherung wurde in Tris-HCl-Puffer durchgeführt; zur Kristallisation wurde jedoch Kaliumphosphat-Puffer verwendet, um die kristallisierungsfördernden Eigenschaften einer anorganischen Salzlösung zu nutzen.

Wie bereits erwähnt, unterliegen Flavinderivate photolytischer Zersetzung (YAGI, 1962):



Lumiflavin

Lumichrom

Die gesamte Anreicherung und spätere Aufbewahrung des Flavodoxins wurde daher konsequent bei möglichst gedämpften Licht und neutralem pH durchgeführt. Das gut reproduzierbare Anreicherungsverfahren wurde im Abschnitt 2.17. beschrieben.

Rohextrakt

Flavodoxin und Ferredoxin verhielten sich in gefriergetrockneten Zellen von C. kluyveri äußerst stabil. Es konnte daher für die Anreicherung von Flavodoxin von lyophilisiertem Zellmaterial ausgegangen und das sehr effiziente Aufschlußverfahren mittels Autolyse (CARNAHAN et al., 1960) angewendet werden. Diese Zellaufschlußmethode erlaubte zudem, gegenüber

dem French-Press- und Ultraschall-Verfahren, den hier notwendigen Einsatz einer größeren Zellmenge.

Batch-DEAE-Cellulose-Chromatographie

Der graugrüne Rohextrakt überschritt im allgemeinen das zur Säulenchromatographie anwendbare Volumen (900 - 1 200 ml). Die erste Adsorption an DEAE-Cellulose erfolgte somit in einem Batch-Verfahren (pH 7,0). Nach einer 15-minütigen Kontaktzeit wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Flavodoxin mit 0,8 M KCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7,3 von der gewaschenen DEAE-Cellulose eluiert.

DEAE-Säulenchromatographie

Das durch Ultrafiltration konzentrierte Eluat wurde auf DEAE-Cellulose-Säulen weiter gereinigt. Abb. 7 gibt das Elutionsdiagramm eines linearen KCl-Gradienten wieder. Flavodoxin wurde unter diesen Bedingungen bei einer Ionenstärke von 0,3 - 0,4 M KCl von der Cellulose als orangegelbe Bande eluiert.

Bio-Gel P-60-Chromatographie

Nach Dialyse und Vereinigung der aktivsten Fraktionen wurde das orangegelbe Konzentrat (30 - 40 ml) der Gelfiltration unterworfen (Abb. 8). Das Elutionsprofil wies nur noch zwei Peaks auf. Die Fraktionen des ersten Peaks wurden als farblose inaktive Protein-Komponenten verworfen. Die Elutionsnummern 21 - 27 repräsentierten die rot-orangefarbenen aktivsten Fraktionen.

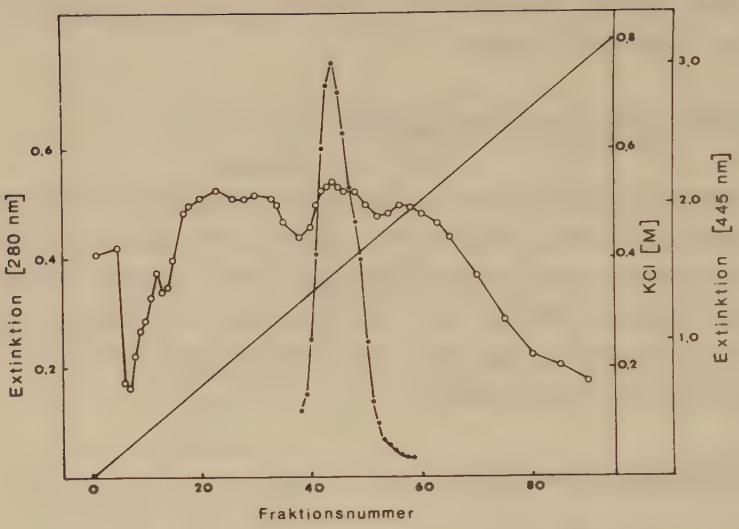


Abb. 7 DEAE-Cellulose-Chromatographie (2. Adsorption)

Die DEAE-Cellulose-Säule (2,6 cm Ø; 23 cm Säulenbett) war gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,3 äquilibriert worden. Adsorbiertes Protein wurde mit einem linearen KCl-Gradienten (0 - 0,8 M KCl) eluiert. Die optische Dichte der Fraktionen (Vol. = 7 ml) wurde bei 280 nm gemessen. Zum Flavodoxinnachweis wurde die Extinktion bei 445 nm gemessen. Flavodoxin wurde mit 0,3 - 0,4 M KCl eluiert.

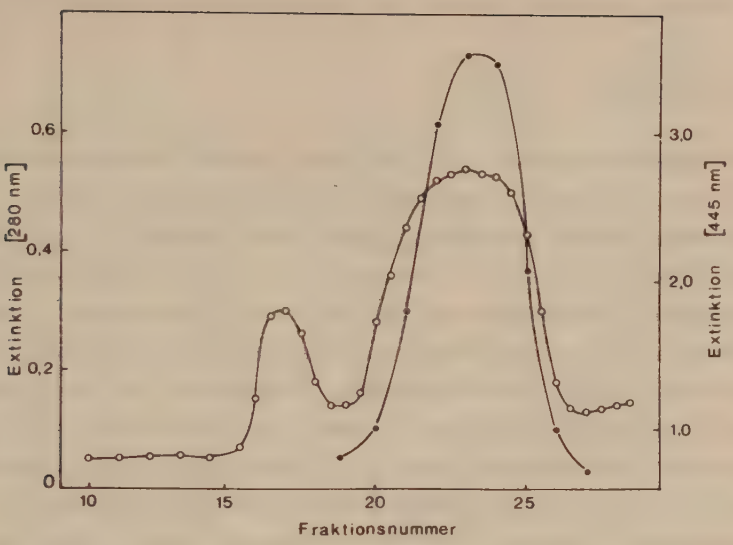


Abb. 8 Bio-Gel P-60-Chromatographie

Die Bio-Gel P-60-Säule (2,5 cm Ø; 28 cm Säulenbett) war gegen 20 mM Tris-HCl, pH 7,3 äquilibriert worden. Flavodoxin wurde mit dem gleichen Puffer eluiert und die Extinktion der orangegelben Fraktionen bei 445 nm gemessen. Flavodoxin wurde eluiert, nachdem 77 ml Puffer durchgelaufen waren.

Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Die Gel-Fraktionen wurden vereinigt und mit pulverisiertem Ammoniumsulfat (AS) versetzt. Bei einer 65 %igen Sättigung der Enzymlösung präzipitierte eine weiße amorphe Proteinkomponente, die durch Zentrifugation entfernt wurde. Der Überstand wurde auf 100 % AS-Sättigung gebracht, das organgerote Sediment in KPO_4-Puffer aufgenommen und gegen 30 mM KPO_4-Puffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde nun zu 68 % mit AS gesättigt, ein feiner weißer Niederschlag durch Zentrifugation entfernt und der Überstand auf 82 % AS gebracht. Hierbei präzipitierte eine irisierende orange-

gelbe Proteinkomponente, während der Überstand kräftig rosa gefärbt war.

Kristallisierung

Die in Phosphatpuffer gelöste und dialysierte Flavodoxinsuspension wurde nun in einem Zeitraum von zwei Tagen auf 75 % AS-Sättigung gebracht. Wurde Ammoniumsulfat schneller zugegeben, fiel Flavodoxin als amorpher Niederschlag aus. Etwa 24 - 36 Stunden nach der 75 %-Sättigung bildeten sich hexagonale Kristallplättchen (Abb. 9), die ein Irisieren der Lösung hervorriefen. Die zunächst orangerote Lösung trennte sich mit einsetzender Kristallbildung auf: die Fld-Kristalle sedimentierten als orangegelbe Schicht, der klare Überstand war von kräftig rosaroter Farbe. Nach zwei Tagen wurden die Protein-Kristalle durch Zentrifugation geerntet und der Überstand auf 82 % Sättigung gebracht. Die dabei auftretenden Kristalle wurden ebenfalls geerntet und mit der Hauptfraktion vereinigt. Nach dem Waschen mit 90 %iger Ammoniumsulfat-Lösung wurden die Kristalle in KPO_4-Puffer gelöst und nach der Dialyse die Ausbeute ermittelt. Das nach den Kriterien der analytischen Disk- und SDS-Elektrophorese homogene Flavodoxinpräparat wurde anschließend bei -20° C aufbewahrt.

Versuche, Kristallbildung auch in Gegenwart von 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,3 zu erreichen, erwiesen sich, im Gegensatz zum C. pasteurianum-Flavodoxin (KNIGHT und HARDY, 1966), als nicht erfolgreich.

Die größten Ausbeuten an Flavodoxin wurden bei P. elsdenii erzielt. Die Ausbeute von C. kluyveri lag um ein Drittel niedriger, übertraf jedoch die Flavodoxinproduktion aller übrigen Bakterien (Tab. 6). Die in diesem Fall mit 70 g Trockenzellen durchgeführte Anreicherung ergab 130 mg homogenes Flavodoxin (1,85 mg Fld/g TG). Die bei C. pasteurianum und C. MP erzielten Flavodoxinausbeuten betrugen nur 3 % der C. kluyveri-Produktion.

Tab. 6 Quantitative Ausbeute der Flavodoxinanreicherung aus verschiedenen Bakterien

Organismus	Ausbeute mg Fld/g TG	Autoren
Peptostreptococcus elsdenii	3,2	MAYHEW und MASSEY (1969)
Clostridium kluyveri	1,85	
Desulfovibrio gigas	1,0	LeGALL und HATCHIKIAN (1967)
Rhodospirillum rubrum	0,75	CUSANOVICH und EDMONDSON (1971)
Synechococcus lividus	0,1 - 0,3	CRESPI et al. (1971)
Desulfovibrio vulgaris	0,14	IRIE (1971)
Clostridium pasteurianum	0,057	KNIGHT und HARDY (1966); MAYHEW (1971)
Clostridium MP	0,057	MAYHEW (1971)
Escherichia coli	(4,2 gesamt)	VETTER und KNAPPE (1971)

Tab. 7 Anreicherungsschema von Flavodoxin mit Pyruvat-Fd-Oxidoreduktase als Testenzym

	Anreicherungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	spezifische Aktivität (U/mg)	Gesamt-Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (U)	Anreicherungs-faktor	Ausbeute (%)
I	Rohextrakt	920	23,98	0,692	22 061	15 266	1	100
II	Batch-DEAE-Cellulose	470	12,98	1,325	6 100	8 083	1,9	53
III	Ultrafiltration PM 10	520	11,44	1,625	5 948	9 666	2,4	63
IV	DEAE-Cellulose-Säule	94	7,7	7,363	723	5 323	10,6	35
V	Bio-Gel P-60	40	6,16	12,824	246	3 155	18,5	21
VI	Ammoniumsulfatfraktio-nierung	37	5,5	14,545	203	2 952	21,0	20
VII	1. Kristallisation	35	3,52	21,874	123	2 690	31,6	18
VIII	2. Kristallisation	32	3,19	21,630	102	2 206	31,8	15

Proteingehalt des Fd-freien Test-Enzyms: 14,9 mg/ml; die Proteinbestimmung in ungereinigten Extrakten wurde nach der Methode von BEISENHERZ (1953) durchgeführt, der Proteingehalt von Flavodoxinlösungen mittels Extinktionskoeffizienten bestimmt (siehe 2.5.4.).

Tab. 8 Anreicherungsschema von Flavodoxin mit Hydrogenase als Testenzym

Anreicherungsschritt		Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	spezifische Aktivität (U/mg)	Gesamt-Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (U)	Anreicherungs-faktor	Ausbeute (%)
I	Rohextrakt	920	23,98	2,96	22 061	65 300	1	100
II	Batch-DEAE-Cellulose	470	12,98	4,16	6 100	25 377	1,4	39
III	Ultrafiltration PM 10	520	11,44	5,42	5 948	32 238	1,8	49,3
IV	DEAE-Cellulose-Säule	94	7,7	59,74	723	43 251	20,2	66,2
V	Bio-Gel P-60	40	6,16	99,837	246	24 559	33,7	37,6
VI	Ammoniumsulfatfraktio-nierung	37	5,5	162,9	203	33 231	55,0	50,7
VII	1. Kristallisation	35	3,52	259,65	123	31 938	87,7	48,9
VIII	2. Kristallisation	32	3,19	270,22	102	27 832	91,3	42,6

Der Proteingehalt des Fd-freien Hydrogenase-Präparates aus regulär gewachsenen C. kluyveri-Zellen betrug 39,9 mg/ml, pH 6,5. Proteinbestimmungen erfolgten wie in Tab. 7 angegeben.

Mit Pyruvat-Fd-Oxidoreduktase aus C. pasteurianum als Testenzym wurde Flavodoxin aus C. kluyveri etwa 32fach angereichert. Die dabei erzielte Ausbeute betrug 15 % (Tab. 7). Der niedrige Wirkungsgrad der Anreicherung war einerseits auf die geringe Empfindlichkeit des Testsystems zurückzuführen. Die größten Verluste traten jedoch jeweils bei Kontakt mit DEAE-Cellulose auf. Die nicht zu umgehenden Schritte führten bei dieser Anreicherung zu insgesamt 75 %igem Verlust der Ausbeute.

Die Flavodoxinanreicherung mit Hydrogenase aus C. kluyveri als Testenzym ergab eine 92fache Anreicherung bei 43 %iger Ausbeute. Die Verluste bei DEAE-Kontakt wurden hier nur beim Batch-Verfahren beobachtet. Die hier unter IV angegebene Aktivitätszunahme wurde in bereits dialysierten Präparaten gemessen. Der in Tab. 7 IV angegebene Aktivitätsverlust war zusätzlich auf hohe Ionenstärke zurückzuführen (0,4 M KCl). Die insgesamt schwankenden Aktivitäten dieser Anreicherung konnten auch zum Teil durch die Gegenwart eines ebenfalls aktiven orangeroten Proteins erklärt werden, das zusammen mit Flavodoxin angereichert wurde (siehe 3.5.).

Rotes Flavoprotein

Die rosarot gefärbten Überstände der Flavodoxin-Kristallisation wurden vereinigt und die Lösung allmählich bis 100 % Ammoniumsulfat gesättigt. Bei 88 - 92 % sedimentierte quantitativ eine rosarote amorphe Schicht, der Überstand war wasserklar. Das Sediment wurde dialysiert und mittels Ultrafiltration konzentriert. Da hier mit der für Flavodoxin spezifischen Anreicherungstechnik (siehe 3.2.3. erster Abschnitt) ein zweites Protein isoliert wurde, schien eine nähere Untersuchung interessant, zumal dieses Protein offensichtlich einen nur durch hohe Salzkonzentration zu trennenden Komplex mit Flavodoxin eingegangen war. Ein ähnliches Protein (ETF) wurde unter analogen Bedingungen aus Peptostreptococcus elsdenii isoliert (MAYHEW und MASSEY, 1971; MAYHEW et al., 1974; WHITFIELD und MAYHEW, 1974). Die spektroskopische und partielle biochemische Charakterisierung ist im Abschnitt 3.5. beschrieben.

Abb. 9 Raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen von Flavodoxin-Kristallen

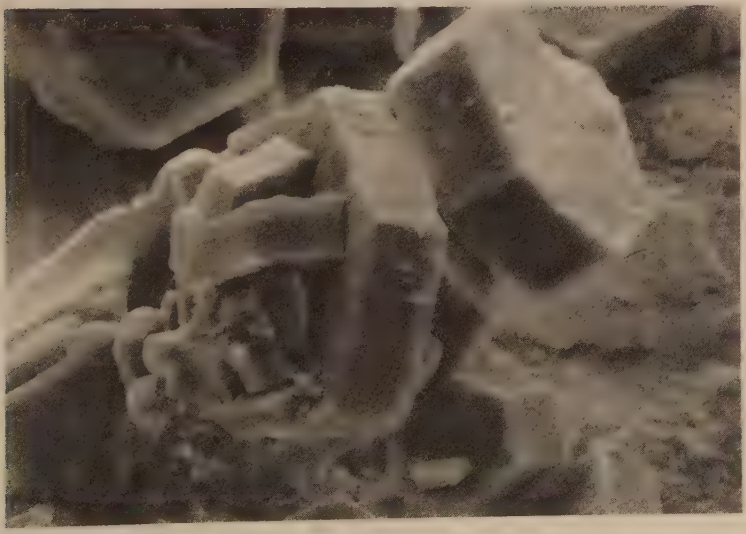
Die Flavodoxinkristalle wurden in einer 82 %igen Ammoniumsulfatlösung eingetrocknet. Die Kristalle wurden mit Kohlenstoff, dann mit Gold und Palladium bedampft (Gesamtschichtdicke 200 Å, Strahlspannung 5 Kilovolt).

(Abbildungen siehe Seite 74 und 75)

Vergrößerung x 907

Vergrößerung x 3 895
Strukturbildung durch Eintrocknung

Vergrößerung x 1 560



Vergrößerung x 1 960

3.2.4. Analytische Disk-Elektrophorese

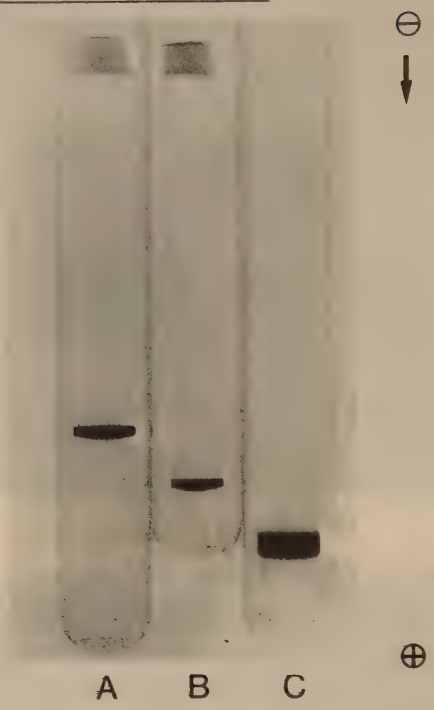


Abb. 10 Analytische Disk-Elektrophorese des Flavodoxins in verschiedenen Phorese-Systemen

Die Elektrophoresen wurden in 7,5 %igen und 15 %igen Gelen bei einer Laufzeit von 45 min bzw. 60 min durchgeführt. Die Methode ist im Abschnitt 2.18. beschrieben.

A)	gereinigtes Fld	(50 µg)	7,5 %	Färbung: Amidoschwarz
B)	"	(50 µg)	7,5 %	Coomassie blue
C)	"	(100 µg)	15 %	Coomassie blue

Die analytische Disk-Elektrophorese zeigte eine durch Ladung und Molekülgröße bestimmte enorme Mobilität des Flavodoxins, die sich im 7,5 %igen Gel

durch mit dem Farbmarker identische elektrophoretische Beweglichkeit auszeichnete. Eine Gelkonzentrationserhöhung auf 15 % und die damit verbundene Porenverengung brachte eine differierende Wanderungsgeschwindigkeit, die durch allmähliche Abtrennung einer gelben Bande während des Laufes optisch zu verfolgen war.

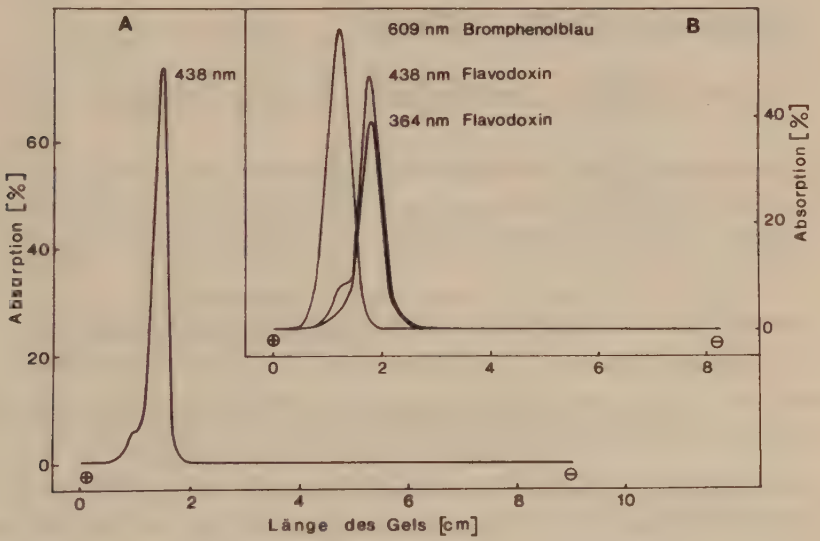


Abb. 11 Densitogramm einer analytischen Disk-Elektrophorese

Die Absorption des mit Coomassie blue angefärbten Flavodoxins wurde bei den oben angegebenen Wellenlängen vor (B) und nach dem Färben (A) im Durchlichtverfahren (Flying-Spot-Densitometer, Vitatron) gemessen.

In Abb. 11 Inset (B) ist die densitometrische Auswertung eines ungefärbten 15 %igen Gels nach dem Elektrophorese-Lauf bei unterschiedlichen Analyse-Wellenlängen dargestellt. Bei 609 nm wurde nur blauer Farbstoff (Bromphenolblau) registriert, bei 438 nm blauer und gelber Farbstoff und bei 364 nur die gelbe Flavodoxinbande. Die dicht beieinander liegenden Peaks ver-

deutlichen die selbst in 15 %igem Gel kaum differierende Mobilität des Flavodoxins zur Farbstoffbande. Abb. 11 (A) zeigt ein repräsentatives, für 7,5 % und 15 % gültiges Densitogramm eines entfärbten Gels. Eine einzige Bande in beiden Systemen zeigte, daß das Flavodoxinpräparat nach den Kriterien der Elektrophorese homogen war.

3.3. Charakterisierung des Flavodoxins

3.3.1. Identifizierung der prosthetischen Gruppe des Flavodoxins

Die Identifizierung der Flavingruppe im Flavodoxinmolekül erfolgte mittels Dünnschicht-Chromatographie nach einer modifizierten Methode von KILGOUR et al. (1957). Die Durchführung ist im Abschnitt 2.25. beschrieben.

Die prosthetische Flavingruppe dissoziierte quantitativ vom Apoprotein durch Einwirkung von SDS, KBr, Wärme und - im Gegensatz zum C. pasteurianum-Flavodoxin (KNIGHT und HARDY, 1966) - auch durch TCA-Behandlung. Zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung wurde die Flavingruppe mit TCA extrahiert (MAYHEW und MASSEY, 1969), das denaturierte Apoflavodoxin durch Sedimentierung abgetrennt und der flavinhaltige Überstand neutralisiert.

Zur Vermeidung photolytischer Zersetzung wurden die Referenzlösungen (Riboflavin, FMN, FAD) und die Probelösung unter stark gedämpften Licht aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte im Dunkeln bei Zimmertemperatur in drei verschiedenen Laufmitteln. In einem System (tert-Butanol-H_2O) erfolgte keinerlei Auftrennung.

Die in Tab. 9 ermittelten Rf-Werte zeigen in beiden Laufmitteln jeweils absolute Kongruenz der FMN- und Proben-Werte. Die prosthetische Gruppe des Flavodoxins von C. kluyveri konnte somit, in Übereinstimmung mit den bisher isolierten Flavodoxinen, als FMN (Riboflavin-5'-phosphat) identifi-

ziert werden.

Tab. 9 Dünnschicht-Chromatographie der prosthetischen Flavingruppe

Flavin	Laufmittel	
	Rf 1	Rf 2
FMN	0,479	0,410
Probe	0,479	0,410
FAD	0,231	0,304
Riboflavin	0,555	0,187

Laufmittel 1) n-Butylalkohol - Essigsäure - H_2O (4 : 3 : 3; v/v/v)
Laufmittel 2) 5 % Na_2HPO_4 in H_2O

3.3.2. Ermittlung der Extinktionskoeffizienten des Flavodoxins

Zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten mußte die prosthetische Flavingruppe vom Apoprotein abgetrennt werden. Die Methoden der Wärme-Dissoziation und TCA-Extraktion wurden bereits erwähnt. Anhand der bekannten Extinktionskoeffizienten des FMN (WHITBY, 1953) konnten über die Extinktion des freien und proteingebundenen Flavins die Koeffizienten ermittelt werden (siehe 2.23.).

In Abb. 12 ist das Spektrum des Flavodoxins vor (B) und nach dem Erhitzen (A) aufgezeichnet. Die Extinktionszunahme ist durch abdissoziiertes FMN zu erklären. Aus analog durchgeführten Messungen mit TCA-extrahiertem FMN ließen sich die in Tab. 10 zusammengefaßten Extinktionskoeffizienten ermitteln. Die Koeffizienten für die Semichinon-Maxima wurden durch Auftragung der Extinktionswerte (z. B. 580 nm) gegen die Werte des 445 nm-Peaks ermittelt. Durch graphische Extrapolation (MAYHEW und MASSEY,

1969) ließ sich die methodisch nicht erfaßbare maximale Konzentration des Semichinons bestimmen. Die Extinktionskoeffizienten der übrigen Maxima wurden auf identische Weise ermittelt.

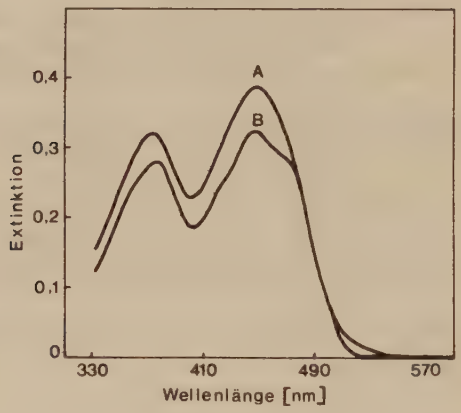


Abb. 12 Spektrum des nativen Flavodoxins und des abdissoziierten FMN

Der Ansatz enthielt 3,2 x 10^{-5}M Fld in 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,3. Die thermische Dissoziation ist unter 2.23.3. beschrieben.

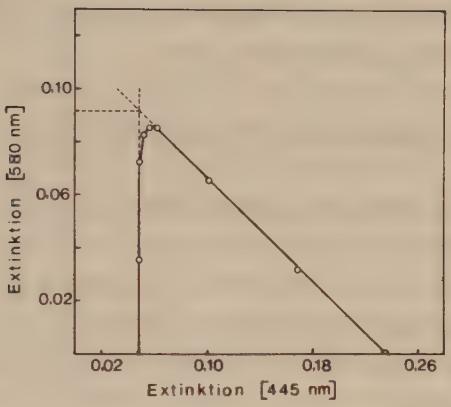


Abb. 13 Beziehung der Semichinonabsorption zur Flavochinonabsorption

Es gelten die für Abb. 12 angegebenen Bedingungen.

Tab. 10 Extinktionskoeffizienten des Flavodoxins

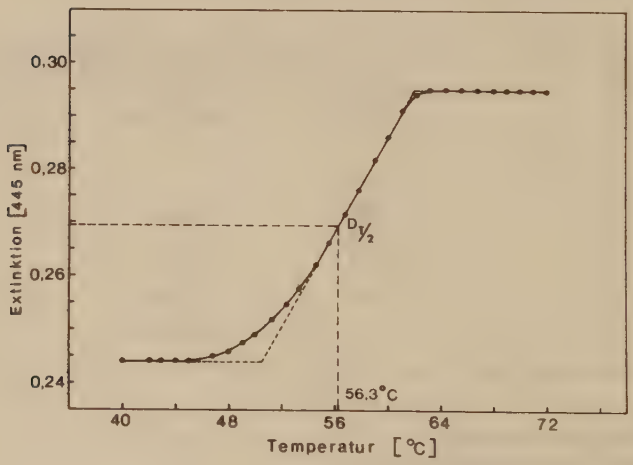
Wellenlänge (nm)	Extinktionskoeffizient (ε) $M^{-1}cm^{-1}$		
	Oxidiert	Semichinon	Reduziert
272	53 600	-	-
350	7 200	8 560	-
377	9 220	5 220	-
445	10 130	2 020	1 670 - 2 000 [1]
580	-	4 140	-

1) 1 670 durch Photoreduktion
2 000 durch Na-Dithionitreduktion

Die Extinktionskoeffizienten stimmten gut mit anderen Flavodoxinen überein (P. elsdenii: 10 200 (445 nm), MAYHEW und MASSEY, 1969; C. pasteurianum: 10 400 (443 nm), MAYHEW, 1971).

3.3.3. Thermische Dissoziation des FMN vom Apoflavodoxin

Die im Abschnitt 3.3.2. beschriebene Dissoziation des FMN wurde mittels diskontinuierlicher Wärmezuführung erreicht. Das Resultat ließ es interessant erscheinen, den gesamten Dissoziationsbereich zu verfolgen (siehe 2.20.4.). Proteingebundenes FMN besitzt generell einen niedrigeren Extinktionskoeffizienten (445 nm) als freies FMN. Durch kontinuierliche Zuführung von Wärmeenergie ließ sich die Bindung der prosthetischen Gruppe vom Protein lösen, angezeigt durch die Extinktionszunahme des frei werdenden Flavins, und der Dissoziationspunkt ($D_{T/2}$) festlegen.



Die von 20° C an verfolgte Extinktion blieb bis 45° C konstant. Nach dieser Temperatur trat eine Extinktionszunahme durch einsetzende Dissoziation auf, die im Bereich von 54 - 61° C linear verlief. Das Abknicken der Kurve bei 61 - 63° C zeigte die vollständig abgelaufene Dissoziation des FMN vom Protein an, erkenntlich durch Extinktionskonstanz trotz weiterer Temperaturerhöhung. Dem gesamten Dissoziationsbereich von 45 - 63° C entsprach unter diesen Bedingungen ein Zeitraum von 18 Minuten. Die Dissoziationskurve zeigte einen $D_{T/2}$-Wert von 56,3° C, korrespondierend zur Hälfte der Extinktionszunahme. Dieser Wert besagte, daß bei einer Temperatur von 56,3° C ein Gleichgewicht von proteingebundenem und dissoziiertem FMN vorlag.

Gegenüber den in der Enzymchemie verwendeten Temperaturen zur Hitzedenaturation deutete dieser vergleichbar niedrige Wert eine schwache Bindung der prosthetischen Gruppe zum Apoprotein an.

Abb. 14 Thermische Dissoziationskurve des Flavodoxins

2 ml Fld-Lösung (0,43 mg/ml) wurden in einem Thermostat mit gekoppeltem linearen Temperatur-Programmgeber kontinuierlich mit einer Heizrate von 60°/Std. erwärmt. Die Extinktion der Probe und Vergleichslösung wurde in 1 min-Abständen gemessen; der Dissoziationspunkt wurde nach Extinktionskorrektur (thermische Ausdehnung) graphisch bestimmt.

3.3.4. Bestimmung des Molekulargewichtes

Das Molekulargewicht des homogenen Flavodoxins wurde nach zwei direkten (Gelfiltration, SDS-Elektrophorese) und einer indirekten Methode (Addition der Aminosäuremolekulargewichte, siehe Aminosäureanalyse) bestimmt. Die bisher bekannten Flavodoxine variieren hinsichtlich ihres Molekulargewichtes in einem Bereich von 13 800 Dalton (Clostridium MP, MAYHEW, 1971) bis 23 000 Dalton (Azotobacter vinelandii, LIN und BOTHE, 1972; Rhodospirillum rubrum, CUSANOVICH und EDMONDSON, 1971). Ausgehend von einer generellen Übereinstimmung im physikalisch-chemischen Charakter aller Flavodoxine, war daher für das Molekulargewicht des Flavodoxins von C. kluyveri ein Wert in diesem Bereich zu erwarten.

Gelfiltration mit Sephadex G-75

Die Ermittlung des Molekulargewichtes von Flavodoxin wurde nach ANDREWS (1964) in zwei voneinander unabhängigen säulenchromatographischen Bestimmungen, bei quantitativer Variierung der Test- und Referenzproteine, durchgeführt (siehe 2.19.1.). Als Referenzproteine wurden Cytochrom c, Chymotrypsinogen A, Ovalbumin und Rinderserumalbumin eingesetzt. Ferritin lag mit einem Molekulargewicht von 540 000 Dalton in der Ausschlußgrenze des Sephadex G-75 (Fraktionierbereich für Peptide und globuläre Proteine: 3 000 - 80 000 Dalton) und diente aufgrund seiner Färbung zur Ermittlung des Ausschlußvolumens (V_o = 152 ml). Das Elutionsprofil der Referenzproteine wurde durch Bestimmung der jeweils spezifischen Absorption erhalten und gegen die dekadischen Logarithmen ihrer bekannten Molekulargewichte aufgezeichnet.

Die Bestimmung mittels Gelfiltration ergab einen Mittelwert von log 4,303, was einem Molekulargewicht von 20 000 $\pm$ 600 Dalton entsprach.

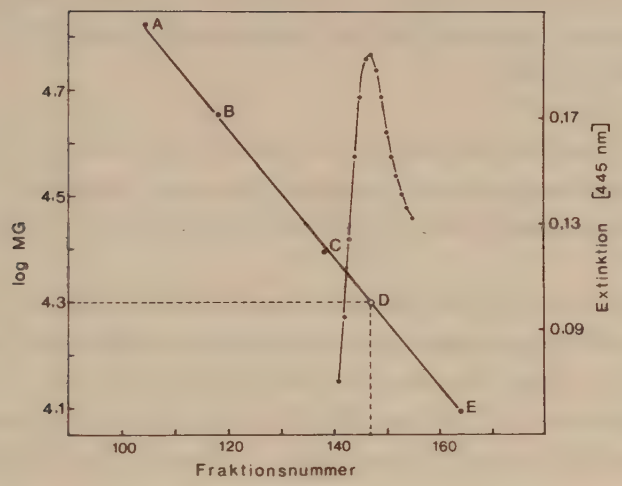


Abb. 15 Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung in Sephadex G-75

Die Durchführung ist im methodischen Teil beschrieben (2.19.1.). In der Abbildung sind die Logarithmen der Molekulargewichte (MG) der Referenzproteine gegen das Elutionsvolumen bzw. Fraktionsnummer aufgetragen. Die Referenzproteine sowie die Angaben der Molekulargewichte entstammten der Eichprotein-Combithek Boehringer, Mannheim. Das Säulenbett betrug 2,5 x 76 cm bei einem Arbeitsdruck von 11 cm Wassersäule. Die Durchflußrate war konstant 9,3 ml/Stunde; die Fraktionen hatten ein Volumen von 1,552 ml.

A: Rinderserumalbumin (67 000); B: Ovalbumin (45 000);
C: Chymotrypsinogen A (25 000); D: Flavodoxin [20 000];
E: Cytochrom c (12 500).

Die Flavodoxinabsorption ($_{445\ nm}$) wurde gegen die Fraktionsnummern aufgetragen. Das Maximum entsprach der Fraktion 147.

SDS-Elektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung

Reduzierte Proteine können mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese als eine Funktion ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (WEBER und OSBORN, 1969; FISH et al., 1970). Na-Dodecylsulfat (SDS) zerlegt

Proteine in ihre Polypeptidketten, deren elektrophoretische Beweglichkeit dem dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte proportional ist (SHAPIRO et al., 1967).

Die SDS-Plattenelektrophorese wurde in einem 10 %igen Gel mit SDS-denaturierten Referenzproteinen (Combithek, Boehringer, Mannheim) und identisch behandeltem Flavodoxin durchgeführt (siehe 2.18.2. und 2.19.2.).

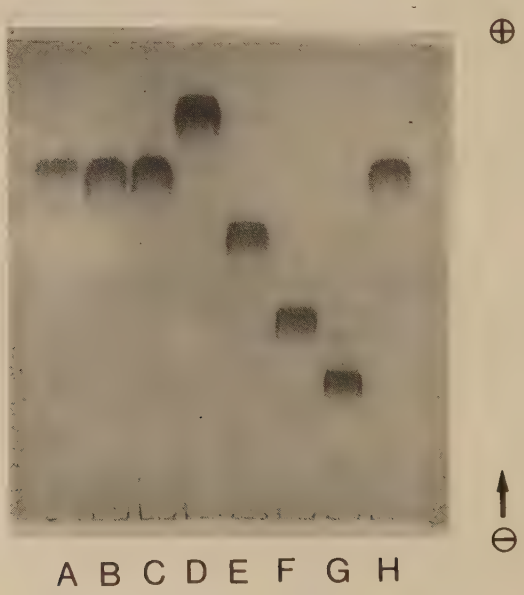
Die Präinkubation von Flavodoxin in Gegenwart von SDS führte zu einer quantitativen Dissoziation der prosthetischen Gruppe (FMN) vom Apoprotein. Die SDS-bedingte Abspaltung von FMN wurde auch bei den Flavodoxinen von E. coli (VETTER und KNAPPE, 1971) und Chlorella fusca (ZUMFT und SPILLER, 1971) beobachtet. Das bei dieser Methode ermittelte Molekulargewicht gilt de facto somit nur für das Apoflavodoxin. Da jedoch das Molekulargewicht der prosthetischen Gruppe FMN klein ist gegenüber dem des Apoproteins (1 : 40), konnte ohne Beeinträchtigung der Meßgenauigkeit das Molekulargewicht des FMN zum ermittelten Wert addiert werden.

Die Berechnung der elektrophoretischen Beweglichkeit (Rf-Werte) erfolgte nach WEBER und OSBORN (1969):

$$Rf = \frac{\text{Wanderungsstrecke Protein}}{\text{Gellänge nach Anfärben}} \times \frac{\text{Gellänge vor Anfärben}}{\text{Wanderungsstrecke Indikatorfarbstoff}}$$

Der Mittelwert der Molekulargewichte beider Methoden wurde somit als 20 100 ($\pm$ 1 200) Dalton angenommen. Auf diesem Wert basiert die weitere Charakterisierung des Flavodoxins von C. kluyveri. Auf die Molekulargewichtsbestimmung durch Addition der Aminosäurengewichte wird im Abschnitt 3.3.9. eingegangen.

Wie bereits erwähnt, werden Proteinmoleküle durch SDS-Einwirkung in ihre nativen Untereinheiten gespalten. Bei den mit Flavodoxin durchgeführten SDS-Elektrophoresen war jeweils nur eine einzige scharf ausgeprägte Proteinbande zu beobachten (Abb. 17). Untereinheiten nach den Kriterien der SDS-Elektrophorese waren demnach im Flavodoxinmolekül nicht existent und konnten bisher auch bei keinem anderen Flavodoxin beobachtet werden.



3.3.5. Bestimmung des molaren Verhältnisses der prosthetischen Gruppe zum Apoprotein

Die prosthetische Gruppe (FMN) wurde durch TCA-Extraktion quantitativ von einem definierten Volumen Flavodoxin (1,29 mg/ml) abgetrennt (siehe 2.25.). Diese, das dissoziierte FMN enthaltende Lösung (3 % TCA) wurde auf genau 2 ml aufgefüllt und die Extinktion in d = 1 cm Küvetten bei 445 nm gegen Puffer gemessen (ΔE_{445} = 0,247). Ein exakt gleiches Ausgangsvolumen (0,54 ml) einer identischen nativen Flavodoxinlösung (1,29 mg/ml) wurde ebenfalls auf 2 ml aufgefüllt und die Extinktion ermittelt (ΔE_{445} = 0,225).

Anhand der bekannten molaren Extinktionskoeffizienten des FMN und des Flavodoxins konnte die Konzentration der beteiligten Komponenten ermittelt werden.

FMN_{445} in 3 % TCA = 11 100 ($M^{-1}cm^{-1}$) (HINKSON, 1968)
Fld_{445} 10 130 ($M^{-1}cm^{-1}$)

Die Konzentrationen ergaben sich zu $2,22 \times 10^{-5}$M FMN und $2,22 \times 10^{-5}$M Flavodoxin (Verhältnis 1 : 1). Je Mol Flavodoxin war demnach, analog zu anderen Flavodoxinen, 1 Mol FMN als prosthetische Gruppe gebunden.

Abb. 17 SDS-Elektrophorese des Apoflavodoxins in einem 10 %igen Polyacrylamid-Gel

Methodik wie Abb. 16. Gel- und Elektrodenpuffer: 25 mM $NaPO_4$, pH 7,1. Laufzeit 5 Stunden, 80 mA, 130 V.

A: 40 µg Flavodoxin; B: 60 µg Flavodoxin;
C: 80 µg Flavodoxin; D: 50 µg Cytochrom c;
E: 50 µg Chymotrypsinogen A; F: 50 µg Ovalbumin;
G: 50 µg Katalase; H: 50 µg Flavodoxin

3.3.6. Bestimmung des Eisengehaltes und der freien Sulfhydryl-Gruppen im Flavodoxin-Molekül

Eine konzentrierte Flavodoxinlösung (3,58 mg/ml) wurde mit der von CAMPBELL (1973) modifizierten Bathophenanthrolin-Methode von CAMERON (1965) auf ihren Eisengehalt untersucht (siehe 2.8.2.). Es konnten keinerlei Hinweise auf ein Vorhandensein von Eisen gefunden werden. Da Flavodoxin seiner physiologischen Bedeutung nur unter Eisenmangel-Bedingungen gerecht wird, stand dieses erwartete Resultat im Einklang zu Analysen anderer Flavodoxine.

Die mit DTNB (Ellman's Reagenz) am Flavodoxinmolekül durchgeführte Bestimmung freier SH-Gruppen ergab ebenfalls negative Resultate. Identisches Verhalten zeigten Flavodoxine von C. pasteurianum (KNIGHT und HARDY, 1966) und E. coli (VETTER und KNAPPE, 1971).

3.3.7. Spektroskopische Charakterisierung des Flavodoxins

Der Name "Flavin" bezeichnet einen redox-aktiven Chromophor, der aus einer heteroaromatischen Isoalloxazingruppe mit Methyl-Substituenten in Position 7 und 8 besteht (Riboflavin). Der Isoalloxazinring kann mit einer monophosphorylierten C5-Seitenkette verknüpft sein (Riboflavin-5'-monophosphat = FMN), die wiederum an ein Adeninnukleotid gekoppelt sein kann (FAD).

Die Oxidoreduktion des Flavins ist sowohl bei 1- als auch bei 2-Elektronenschritten thermodynamisch reversibel und erfüllt damit die Kriterien eines "chinoiden" Redox-Systems (HEMMERICH et al., 1965). Im folgenden werden die gebräuchlichen Bezeichnungen "Flavochinon" für die oxidierte Form, "Flavosemichinon" für die radikalische und "Flavohydrochinon" für die vollständig reduzierte Form verwendet.

Flavine besitzen in der stabilen oxidierten Chinonform die charakteristische Gelfärbung und im wesentlichen identische Absorption. Die Spektren von oxidiertem Riboflavin und FMN besitzen Maxima bei 266, 373 und 445 nm, FAD absorbiert bei 263, 375 und 450 nm. Der Peak der "370 nm-Bande" ist sehr von der Polarität des Lösungsmittels abhängig und variiert von 373 nm in Wasser bis 330 nm in organischen Lösungsmitteln (HARBURY et al., 1959). Die "450 nm-Bande" dagegen zeigt viel geringere Wirkung gegenüber polaren oder nicht-polaren Lösungsmitteln und besitzt somit die größere Aussagekraft. In der vollständig reduzierten farblosen Hydrochinon-Form weisen Flavine eine zum langwelligen Bereich abfallende Absorption und keinerlei ausgeprägte Maxima auf.

Flavodoxine zeigen aufgrund ihrer FMN-Gruppe ein typisches Flavin-Spektrum mit einem Maximum im Bereich von 443 nm (C. pasteurianum, KNIGHT und HARDY, 1966) bis 467 nm (E. coli, VETTER und KNAPPE, 1971). Die gegenüber freiem FMN eintretenden Rotverschiebungen einiger Flavodoxine werden mit Flavin-Protein-Wechselbeziehungen erklärt (LeGALL und HATCHIKIAN, 1967).

Oxidiertes Flavodoxin von C. kluyveri besitzt Maxima bei 272 nm, 377 nm, 445 nm, Schultern bei 290 nm und 470 nm und Minima bei 315 nm und 405 nm.

Der Peak bei 272 nm kann als Resultat der Überlappung des Flavin- (266 nm) und des Proteinpeaks (280 nm) angesehen werden. Für Spektren in einem Bereich unterhalb 300 nm mußte die Lösung aufgrund des höheren Extinktionskoeffizienten der 272 nm-Bande verdünnt werden. Wurde zur Reduktion von Flavodoxin Na-Dithionit zugegeben (Absorptionsmaximum 315 nm), war dessen Absorption derartig stark, daß Extinktionsmessungen bei Wellenlängen kürzer als 315 nm nicht sinnvoll erschienen. Im folgenden wurden daher Flavodoxinspektren generell im Bereich von 330 - 700 nm aufgenommen.

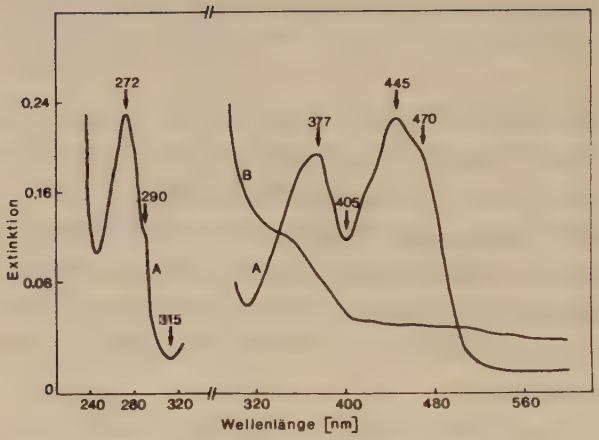


Abb. 18 Absorptionsspektrum des Flavodoxins von C. kluyveri

Spektrum des oxidierten (A) und Na-Dithionit-reduzierten (B) Flavodoxins ($2,2 \times 10^{-5}$ M Fld in 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,3). Für das Spektrum bei Wellenlängen < 300 nm wurde die Lösung 5fach verdünnt.

Die Maxima stimmten im wesentlichen mit anderen Flavodoxinen überein. Auffallende Ähnlichkeit ergab sich jedoch zum Flavodoxin von P. elsdenii:

C. pasteurianum - Maxima:	443 nm	374 nm	272 nm
P. elsdenii " :	445 nm	377 nm	272 nm
C. kluyveri " :	445 nm	377 nm	272 nm

Beim Vergleich von C. kluyveri mit anderen Fld-produzierenden Bakterien konnte die zu erwartende Homologie zur gleichen Spezies nicht beobachtet werden. Im Flavingehalt, der Flavodoxinausbeute und der hier nicht näher diskutierten Anreicherungstechnik wies C. kluyveri engere Beziehung zu P. elsdenii als zu C. pasteurianum oder Clostridium MP auf. Diese Beobachtung wurde weiter gestützt durch die übereinstimmende TCA-Dissoziation

des FMN (FMN von C. pasteurianum nicht TCA-dissoziierbar) und durch nahezu absolute Kongruenz im optischen Verhalten. Im Zuge der weiteren Charakterisierung wurden zusätzliche Vergleiche vorgenommen und in den einzelnen Abschnitten beschrieben.

3.3.7.1. Zirkular Dichroismus (CD)-Spektren

Die Drehung des Lichtes in optisch aktiven Medien beruht auf der unterschiedlichen Fortpflanzungsgeschwindigkeit von rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht, das zudem verschieden stark absorbiert wird (zirkularer Dichroismus). Das austretende Licht ist nicht mehr linear, sondern elliptisch polarisiert. So ergibt sich, daß die Differenzen für die verschiedenen Banden einer optisch aktiven Substanz verschiedene Vorzeichen besitzen, da einmal der linkszirkular, zum anderen der rechtszirkular polarisierte Strahl stärker absorbiert wird. Intensität und Absorptionseigenschaften sind dabei vom Molekülbau (Chiralität) der Zentren in der engsten Umgebung des Chromophors abhängig. CD-Analysen geben somit die Möglichkeit, direkte strukturelle Eigenschaften der optisch aktiven Substanz zu erkennen, die wiederum auf Beziehungen der Flavin-Protein-Bindung und die enzymatische Aktivität schließen lassen.

TOLLIN konnte 1971 zeigen, daß durch CD-Messungen die enzymatischen Eigenschaften eines Flavoproteins zu bestimmen sind (Dehydrogenasen - Oxidasen) und daß anhand der CD-Peaks Aussagen über die Redoxeigenschaften möglich sind (EDMONDSON und TOLLIN, 1971).

Da der freie Isoalloxazinring optisch inaktiv ist, sind alle CD-Peaks durch die optisch aktive Ribityl-Seitenkette und die asymmetrische Konfiguration des Proteinmoleküls festgelegt (EDMONDSON und TOLLIN, 1971).

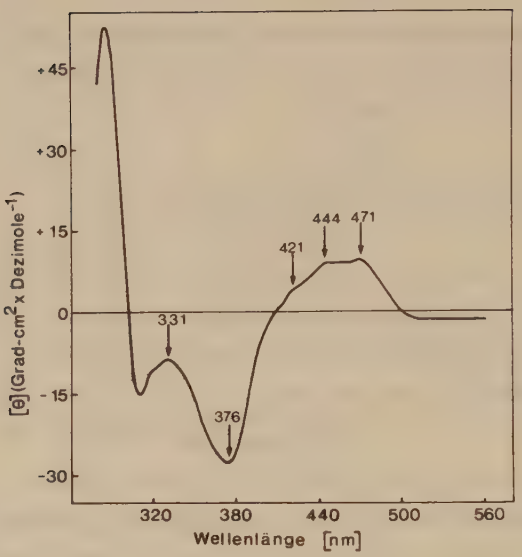


Abb. 19 CD-Spektrum des oxidierten Flavodoxins

Der Ansatz enthielt in einer zylindrischen Quarzküvette (d = 1 cm): 1,81 mg Fld/ml in 25 mM KPO_4-Puffer, pH 7,3. Die Durchführung ist unter 2.20.3. beschrieben.

Die in Abb. 19 gezeigte Absorption im langwelligen Bereich (>400 nm) war charakteristisch für die molekulare Umgebung des Chromophors. Unterschiede in den Flavin-Bindungsstellen verschiedener Flavodoxine würden sich hier deutlich abzeichnen. Flavodoxin von C. kluyveri wies positive Peaks bei 471 nm, 444 nm und 421 nm auf und negative Peaks bei 376 nm und 331 nm. Der positive Peak bei 285 nm rührte von den starken Dichroismus-Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren her (EDMONDSON und TOLLIN, 1971).

Den Vorzeichenwechsel der Elliptizität bei etwa 400 nm und die Maxima im Bereich von 400 - 500 nm nahmen D'ANNA und TOLLIN (1972) zum Anlaß,

bisher bekannte Flavodoxine einer Klassifizierung zu unterziehen. Basierend auf ihren Absorptionseigenschaften und CD-Charakteristika, stellten sie dem "Clostridien"-Typ (C. pasteurianum; C. MP; P. elsdenii) den "Rubrum"-Typ gegenüber (R. rubrum; D. vulgaris; A. vinelandii). Beim ersten Typ erfolgte der Vorzeichenwechsel bei etwa 400 nm, der "Rubrum"-Typ zeigte einen Kreuzungspunkt bei 440 nm. Die Angehörigen des zweiten Typs der Flavodoxine wiesen sowohl in CD-als auch in Absorptionsspektren gegenüber FMN eine "Rotverschiebung" (Verschiebung des Peaks zu längeren Wellenlängen) auf, die EDMONDSON und TOLLIN (1971) mit unterschiedlicher Konfiguration der Proteinmoleküle erklärten.

C. kluyveri-Flavodoxin konnte aufgrund seines CD-Spektrums in die Klasse des "Clostridien"-Typs eingeordnet werden. Innerhalb der Clostridienklasse wiederum ließ sich bemerkenswerte Analogie zum P. elsdenii-Flavodoxin erkennen.

3.3.7.2. Fluoreszenzmessungen am nativen Flavodoxin

Flavine zeigen eine ausgeprägte gelbgrüne Fluoreszenz mit einem breiten Emissionsmaximum im Bereich von 520 - 530 nm. Proteingebundene Flavine und native Flavodoxine weisen jedoch eine stark verminderte Fluoreszenz auf. Flavodoxin von C. kluyveri besaß eine derartig schwache Fluoreszenz, daß diese erst durch apparative Analyse kenntlich gemacht werden konnte (siehe 2.20.5.).

Die in Abb. 20 (B) dargestellte Kurve verdeutlicht die Anregungsmaxima des Flavodoxinmoleküls. Der Peak bei 270 nm repräsentiert das Proteinmaximum, die Peaks bei 410 nm, 475 nm und 520 nm stellen typische Anregungsmaxima für Flavine (Flavoproteine) dar. Da bei Flavinen häufig die Anregungswellenlänge mit dem Emissionsmaximum identisch ist (hier: 520 nm), wurde der nächst niedrigere Peak bei 475 nm als basale Anregungswellenlänge für das Emissionsspektrum (A) gewählt. Das Emissionsmaximum (A) bei 520 nm

(Pfeil) verdeutlicht die schwach ausgeprägte Fluoreszenz (etwa 3 % gegenüber freiem FMN) des nativen C. kluyveri-Flavodoxins.

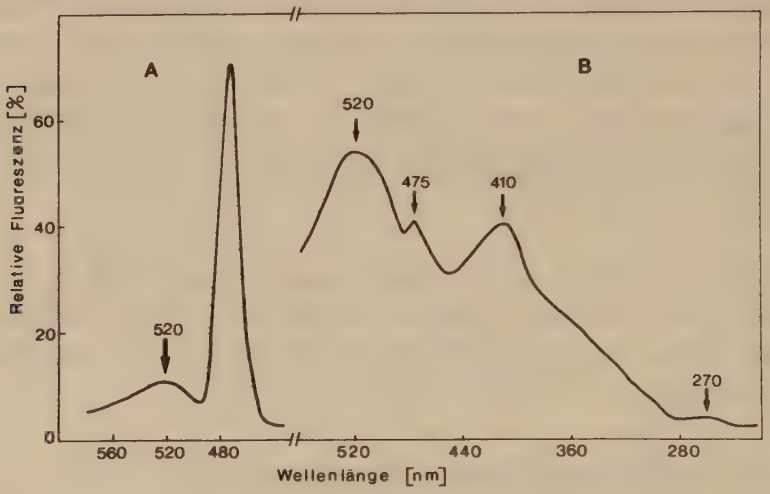
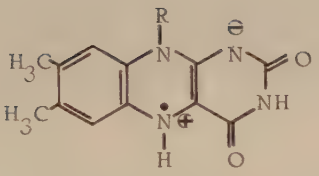


Abb. 20 Fluoreszenzspektrum von nativem Flavodoxin

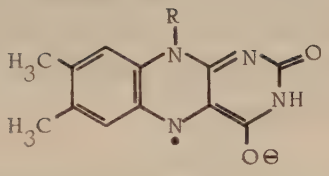
Die Küvette enthielt 1,29 mg Fld/ml in KPO_4-Puffer, pH 7,3. Für das Anregungsspektrum (B) war der Analyzer auf Stellung 0 ausgerichtet, Exciter: 220 - 600 nm. Beim Emissionsspektrum (A) wurde der Exciter bei 475 nm fixiert, Analyzer: 220 - 600 nm (Hitachi Arbeitsanleitung).

3.3.7.3. Radikal-(Semichinon)-Form des Flavodoxins

Halbreduzierte oder Semichinon-Formen der Flavoproteine weisen veränderte und für den Radikal-Typ spezifische Absorptionsmaxima auf. Im allgemeinen bilden Oxidasen die rote (Anion) Form, während Dehydrogenasen vorzugsweise die blaue (neutrale) Semichinon-Form einnehmen (MASSEY et al., 1969):



neutrales Semichinon
(blau)



Semichinon-Anion
(rot)

Das für das Semichinon-Anion charakteristische Maximum liegt im Bereich von 490 - 500 nm, für das neutrale Semichinon bei 580 nm. Die Absorption bei 450 nm ist in beiden Radikalen drastisch reduziert und ohne spezifische Bedeutung.

Zur Identifizierung des Radikal-Typs wurde Flavodoxin in einer anaerob verschlossenen Küvette mit steigenden Konzentrationen einer Na-Dithionitlösung versetzt und das Differenzspektrum des (halb)reduzierten Flavodoxins minus oxidiertem Fld aufgezeichnet (siehe 2.20.2. und 2.21.).

Die in Abb. 21 (A) dargestellte Absorption des Flavosemichinons minus der Absorption des oxidierten Flavodoxins ließ sofort das Wegfallen der 450 nm-Bande des halb- bzw. vollständig reduzierten Flavins erkennen (hier durch die negative Extinktion verdeutlicht). Die im Bereich von 490 - 690 nm neu auftretende Absorption (positive Extinktion gegenüber oxidiertem Flavodoxin) hatte einen ausgeprägten Peak bei 580 nm, der das Charakteristikum des neutralen Semichinons darstellt. Die Flavodoxinlösung war von gelb in ein kräftiges blauviolett umgeschlagen. Der Verlauf der Kurve B zeigt ebenfalls den Verlust der 450 nm-Bande, aber auch die Abnahme der Semichinon-Absorption in dem eben erwähnten Bereich: die Fld-Lösung wurde zum farblosen Flavohydrochinon reduziert.

Flavodoxin von C. kluyveri bildet im Einklang mit allen bisher bekannten Flavodoxinen die blaue, neutrale Semichinonform. Nach der Klassifizierung von MASSEY et al. (1969) können demnach Flavodoxine, in Übereinstimmung mit ihrer physiologischen Aktivität, der Klasse der Dehydrogenasen zugeordnet werden.

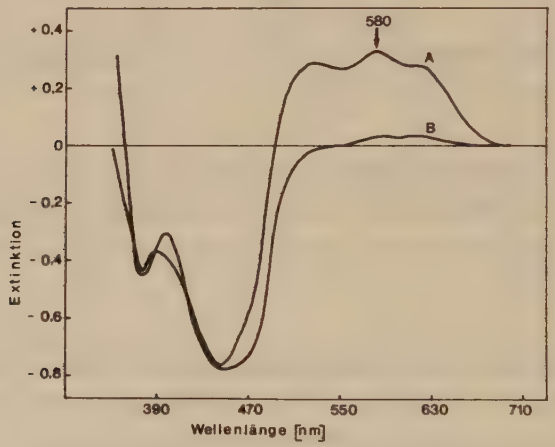


Abb. 21 Differenzspektrum des Flavodoxins

Beide Küvetten enthielten 7,8 x 10^{-5} M Fld in 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,3. Eine Küvette wurde anaerob verschlossen und Fld durch Zugabe von 20 µl-Portionen einer 2 mM Na-Dithionitlösung über die Semichinonstufe zum Hydrochinon reduziert.

Kurve A: Flavosemichinon minus Flavochinon
Kurve B: Flavohydrochinon minus Flavochinon

3.3.7.4. Anaerobe Photoreduktion des Flavodoxins

Die Untersuchung der Redoxeigenschaften von Flavoproteinen kann durch diskontinuierliche Zugabe von Na-Dithionit erfolgen. Technisch einfacher

und empfindlicher ist die anaerobe Photoreduktion, der Flavine in Gegenwart potentieller Elektronendonatoren wie EDTA unterliegen (MASSEY und PALMER, 1966). Wesentliche Aufschlüsse auf das physiologische Redoxverhalten gibt der zeitliche Verlauf der Reduktion und der Auto-Reoxidation.

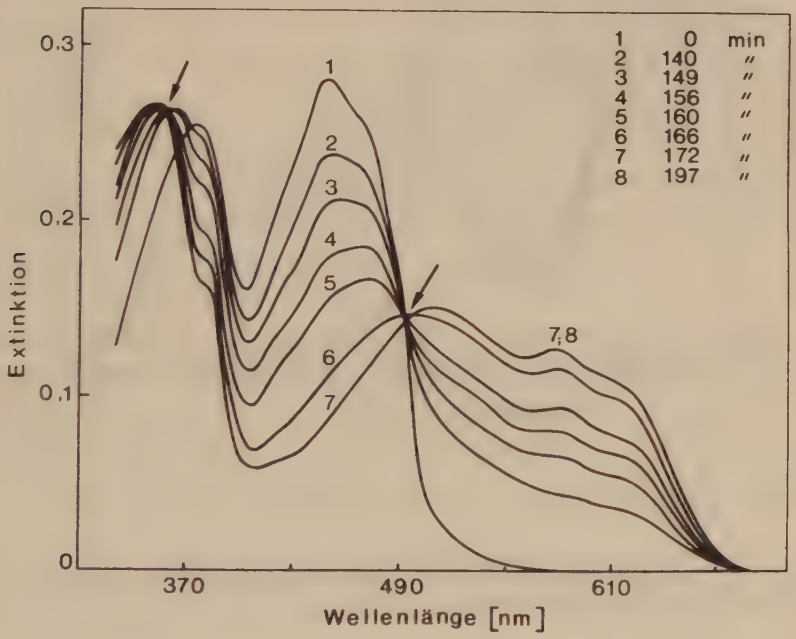


Abb. 22 Photoreduktion von Flavodoxin (pH 5,7)

Der Ansatz enthielt 2,76 x 10^{-5}M Fld; 150 mM Na-Acetat und 60 mM EDTA, pH 5,7. Die Durchführung ist im Abschnitt 2.22. beschrieben. Die Zeiten der Lichteinwirkung sind im Inset angegeben. Die Pfeile geben isosbestische Punkte an.

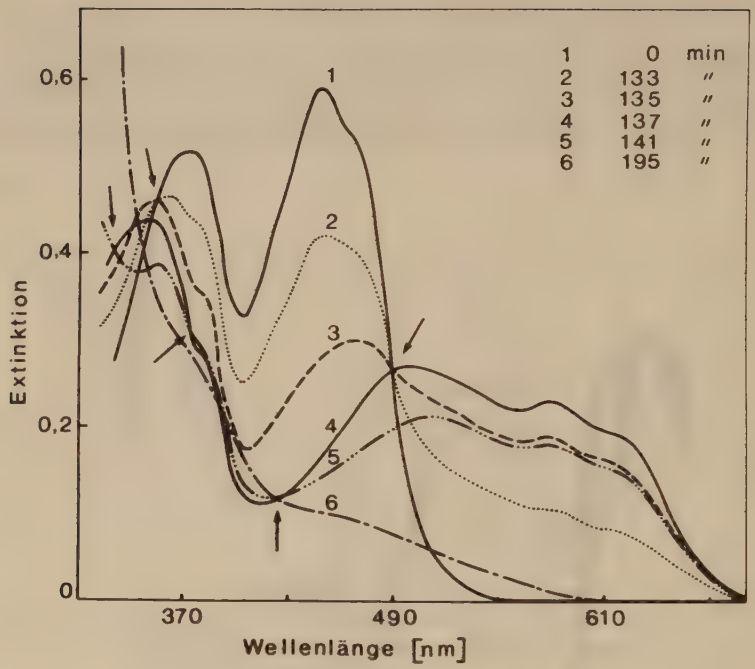


Abb. 23 Photoreduktion von Flavodoxin (pH 10,2)

Der Ansatz enthielt 6,21 x 10^{-5} M Fld; 40 mM Glycin-NaOH und 60 mM EDTA, pH 10,2. Durchführung wie Abb. 22.

Wie man den Abb. 22 und 23 entnehmen kann, war die Rate und Intensität der Photoreduktion pH-abhängig. Bei pH $<$ 7 trat die Reduktion zum Flavosemichinon (Maximum bei 580 nm) erheblich langsamer ein als bei einem pH $>$ 7. Zudem erreichte die durch Lichtenergie gesteuerte Reduktion bei niedrigen pH-Werten nur die Stufe des Semichinons, während bei höheren pH-Werten die Reduktion bis zum Flavohydrochinon fortschritt. Der charakteristische Verlauf der Semichinon-Absorptionskurve war bei beiden pH-Werten identisch (Maxima bei 350 nm, 505 nm, 580 nm und Schultern bei

377 nm und 620 nm).

Die in den beiden Abbildungen eingezeichneten Pfeile markieren die isosbestischen Punkte der Absorptionskurven. Da in der Lösung ein kontinuierliches binäres Gleichgewicht zwischen der oxidierten- und Semichinonform einer einzigen Substanz vorlag, änderte sich die Extinktion synchron zur Konzentrationsänderung der beiden Komponenten. Die Extinktionskoeffizienten beider Formen waren an den isosbestischen Punkten gleich. Das Auftreten von isosbestischen Punkten (bei 357 nm und 492 nm, pH 5,7) zeigte, daß ein binäres Gleichgewicht eines Stoffes in zwei verschiedenen Formen vorlag, nämlich Flavochinon und Flavosemichinon. Die Spektren im zweiten Reduktionsschritt wiesen isosbestische Punkte bei 333 nm, 372 nm und 425 nm auf. Diese zeigten, daß wiederum nur zwei absorbierende Substanzen, Flavosemichinon und Flavohydrochinon, vorlagen.

Flavodoxin von C. kluyveri wurde nach etwa 130 min zum Semichinon reduziert, während P. elsdenii-Fld bereits nach 30 min in dieser Form vorlag (MAYHEW und MASSEY, 1969). Wesentlich längere Belichtung (120 Stunden) war dagegen für das Flavodoxin von R. rubrum erforderlich (CUSANOVICH und EDMONDSON, 1971).

Setzte man das anaerobe, reduzierte Flavodoxin für eine kurze Zeitspanne dem Luftsauerstoff aus, so trat eine außerordentlich schnelle Auto-Reoxidation ein.

Reoxidationskurven zeigten identischen Verlauf mit den Reduktionskurven. Aus der Abb. 24 läßt sich die bemerkenswerte Autoxidationsaktivität des Flavodoxins erkennen. Repräsentative Mittelwerte verschiedener Messungen ergaben, daß bereits nach 3,5 Sekunden 97 % des Flavins von der Semichinonform in den oxidierten Zustand gelangt waren. Die Oxidationszeit vom Hydrochinon zum Flavochinon betrug 13 Sekunden bei pH 9,4 und 20 Sekunden bei pH 5,6.

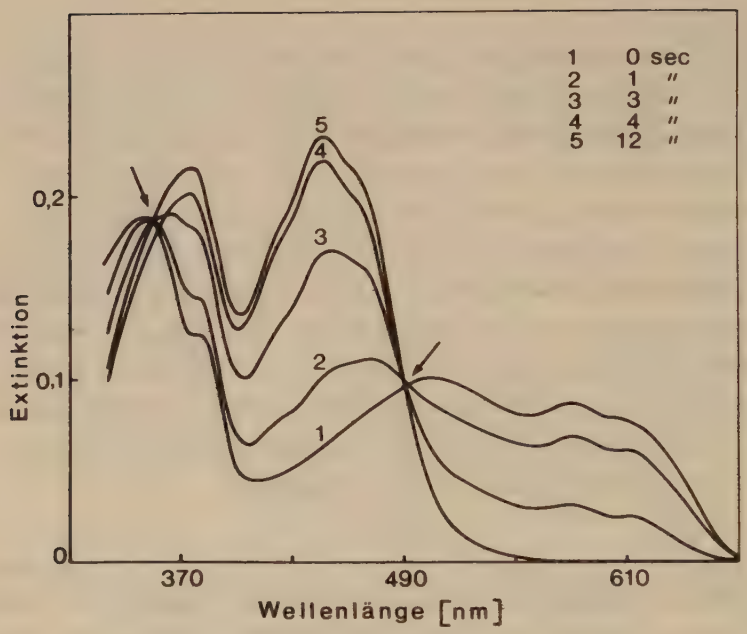


Abb. 24 Auto-Reoxidation des Flavosemichinons

Es gelten die unter Abb. 23 gemachten Angaben ($2{,}3 \times 10^{-5}$ M Flavodoxin). Die Küvette wurde nach erfolgter Reduktion in den oben angegebenen Intervallen dem Luftsauerstoff ausgesetzt, sofort wieder verschlossen und das Spektrum aufgenommen.

Überträgt man das in vitro gemessene Verhalten auf den physiologischen Zustand, kommt diese Eigenschaft des Flavodoxins dem Stoffwechsel von C. kluyveri entgegen. Flavodoxin läßt sich relativ schwer reduzieren und nimmt somit nur "unter Zwang" und nur überschüssige Elektronen auf. Einmal reduziert hat es das Bestreben, die Elektronen sofort abzugeben und kann damit die katalytische Aktivität der Enzyme (Hydrogenase) unterstützen. Auf diese Eigenschaft des Flavodoxins wird in der Diskussion näher eingegangen.

3.3.8. Anaerobe Titration von Flavodoxin mit Na-Dithionit

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, daß Flavodoxin über eine stabile Zwischenstufe (Semichinon) durch Licht in Gegenwart von EDTA oder Na-Dithionit vollständig reduziert wird. Die Stöchiometrie dieser Reduktion kann durch Titration mit geeigneten Reduktionsmitteln erfaßt werden.

Na-Dithionit befindet sich in Lösung im folgenden Gleichgewicht:

$$S_2O_4^{2-} \rightleftharpoons 2\,SO_2^-$$

Ein Mol einer Dithionitlösung enthält somit zwei Reduktionsäquivalente. Durch anaerobe Titration von Flavodoxin wurde dieses zum Hydrochinon reduziert. Die Titrationskurven waren im Verlauf völlig identisch mit den Photoreduktionskurven (siehe Abb. 22). Wurde die Anzahl der Mole Dithionit pro Mol Flavodoxin gegen die Extinktionswerte der charakteristischen Peaks (445 nm: Flavochinon; 580 nm: Semichinon) aufgetragen, ließ sich eine einfache Stöchiometrie erkennen (siehe 2.21.).

In Abb. 25 kann die Semichinonbildung anhand der Zunahme der Extinktion (580 nm) bis zu einem Wert von 0,5 Mol Na-Dithionit je Mol Protein verfolgt werden. Durch weitere Zugabe des Reduktionsmittels nahm die Semichinonabsorption linear ab. Ein Mol Flavodoxin wurde demnach in zwei Schritten durch ein Mol (= 2 Reduktionsäquivalente) Na-Dithionit reduziert. Jeder Schritt benötigte ein Reduktionsäquivalent (SO_2^-) und war für sich reversibel.

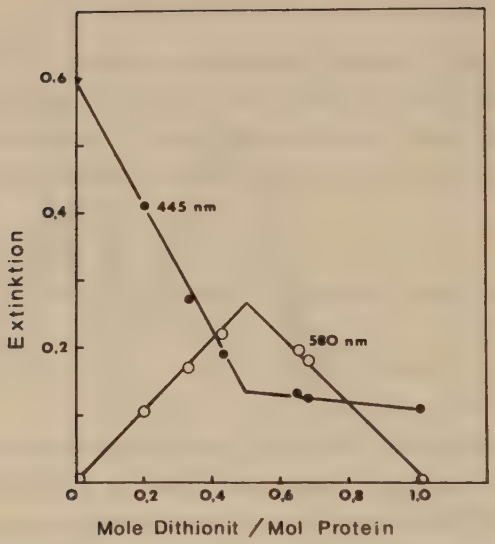


Abb. 25 Anaerobe Titration von Flavodoxin

Der Ansatz enthielt: 110 nMole Fld in 1,75 ml 40 mM Glycin-NaOH-Puffer, pH 8,7. Die Titration wurde mit einer 1 mM Na-Dithionit-Lösung in 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 durchgeführt. Die Küvette wurde mehrfach evakuiert und mit Stickstoff äquilibriert. Es wurden 0; 0,2; 0,33; 0,43; 0,65; 0,68 und 1,04 Mole Dithionit pro Mol Protein zugegeben.

Die vollständige Reduktion von Flavodoxin mit Dithionit erfolgte demnach in zwei aufeinander folgenden 1-Elektronen-Schritten und kann wie folgt beschrieben werden:

$$FldH + H^+ + SO_2^- \longrightarrow FldH_2 + SO_2$$
$$FldH_2 + SO_2^- \longrightarrow FldH_2^- + SO_2$$

(MAYHEW und MASSEY, 1973)

Dieser übersichtlichen Stöchiometrie gehorchen ebenfalls die Flavodoxine von Clostridium MP (MAYHEW, 1971) und P. elsdenii (MAYHEW et al.,

1968). Unklar ist bisher das Verhalten der Flavodoxine von C. pasteurianum (MAYHEW, 1971), A. vinelandii (EDMONDSON und TOLLIN, 1971) und Ana cystis nidulans (ENTSCH und SMILLIE, 1972), deren Reduktion vom Semichinon zum Hydrochinon nur durch Zugabe eines großen Überschusses an Na-Dithionit erfolgt.

3.3.9. Aminosäurezusammensetzung des Flavodoxins

Im Zuge der Anreicherung zeigte Flavodoxin eine ausgeprägte Affinität zu DEAE-Cellulose. Diese Beobachtung ließ auf einen Überschuß an sauren Aminosäuren schließen. Es schien interessant, die qualitative und quantitative Aminosäurezusammensetzung des Flavodoxins zu bestimmen und mögliche Hinweise auf die Flavin-Protein-Bindung zu erhalten. Der Bestimmungsgenauigkeit kam dabei das geringe Molekulargewicht des Flavodoxins entgegen. Zur Analyse wurde Flavodoxin einer 24- bzw. 72stündigen HCl-Hydrolyse unterworfen. Die ermittelten Aminosäurereste je Mol FMN sind in Tab. 11 zusammengestellt (siehe 2.27.).

Die in Gegenwart von 6 N HCl vorgenommene Hydrolyse führte zur Zersetzung des Tryptophans. Diese Aminosäure mußte daher separat bestimmt werden (siehe 2.27.2.). Histidin konnte im Präparat I nicht nachgewiesen werden und lag im Präparat II in einer Größenordnung von $< 0,5$ Mol/Mol FMN vor. Hieraus wurde eine Beteiligung dieser Aminosäure am Flavodoxinmolekül von C. kluyveri ausgeschlossen.

Die in Tab. 11 wiedergegebene Zusammensetzung des Aminosäuregehaltes des Flavodoxins bestätigte die oben formulierte Überlegung. Flavodoxin enthielt einen Überschuß an sauren Aminosäuren (23,4 % = 45 Reste) und einen geringen Anteil basischer Aminosäuren (8,3 % = 16 Reste). Den weitaus größten Teil repräsentierten hydrophobe (41,7 % = 80 Reste) und neutrale Aminosäuren (26,6 % = 51 Reste).

Tab. 11 Aminosäuregehalt des Flavodoxins

Aminosäure	HCl-Hydrolyse 24 Std. I	72 Std. I	24 Std. II	Aminosäurezusammensetzung
	Mole/Mol FMN			Reste/Mol FMN
Asp	15,9	15,9	16,4	16
Thr	3,9	4,1	4,1	4
Ser	13,1	13,2	12,7	13
Glu	28,9	29,8	29,7	29
Pro	4,3	-	4,2	4
Gly	26,9	26,7	27,1	27
Ala	20,9	20,9	21,1	21
Cys 1)	1,0	-	1,2	1
Val	17,1	17,1	16,7	17
Met	6,9	6,6	7,1	7
Ile	8,0	8,4	8,2	8
Leu	13,8	14,0	13,5	14
Tyr	5,8	6,2	6,0	6
Phe	5,0	5,3	4,8	5
Lys	12,2	12,2	11,9	12
His	-	-	-	0
Arg	4,4	3,3	4,1	4
Try 2)	4,4	-	4,2	4
Total				192

Die Addition der Molekulargewichte der Aminosäurereste ergab einen Wert von 21 100 Dalton. Durch Einbeziehung des FMN-Molekulargewichtes (FMN zu Protein = 1 : 1) wurde für das Flavodoxinmolekül ein Molekulargewicht von 21 500 Dalton ermittelt. Dieser Wert stand in guter Übereinstimmung mit den im Abschnitt 3.3.4. ermittelten Molekulargewichten von 20 000 bzw. 20 200 Dalton.

Eine mit nativem Flavodoxin durchgeführte Analyse auf freie Sulfhydryl-Gruppen (Cystein) führte zu negativen Resultaten (siehe 3.3.6.). Bei der HCl-Hydrolyse konnte das unter diesen Bedingungen stabile Cystein bzw. Halb-Cystin ebenfalls nicht gefunden werden. Wurde jedoch zur Aminosäurebestimmung nicht natives Flavodoxin, sondern das FMN-freie Apoprotein eingesetzt, konnten 1,07 - 1,2 Mole Cystein je Mol FMN gefunden werden. Diese Beobachtungen ließen auf eine Beteiligung des Cysteins an der Bindung des FMN zum Apoprotein schließen. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Flavodoxinen von E. coli (VETTER und KNAPPE, 1971) und C. pasteurianum (KNIGHT und HARDY, 1967) beschrieben.

Die Aminosäurebestimmung wurde mit einem Beckman Amino Acid Analyzer durchgeführt. Die Spalten I und II repräsentieren zwei verschiedene Anreicherungen. I stellt den Mittelwert von 6 Messungen, II den Mittelwert von 10 Messungen dar.

1) Cystein wurde mit Apoflavodoxin nach der Methode von ELLMAN (1959) bestimmt. 2) Tryptophan wurde mit der von HARRISON und HOFMANN (1961) modifizierten Methode von SPIES und CHAMBERS (1949) bestimmt.

3.4. Untersuchung der biologischen Aktivität des Flavodoxins

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Anreicherung des Flavodoxins und seine physikalisch-chemische Charakterisierung beschrieben. Der folgende Teil gilt der physiologischen Untersuchung des Flavodoxins und seiner Effektivität im Ersetzen des Ferredoxins in enzymatischen Reaktionen. Zu den direkt Fd-abhängigen Enzymkomplexen in C. kluyveri zählen die Hydrogenase, NAD(P)-Ferredoxin-Reduktasen und die Pyruvat-Synthase. Bei allen aufgeführten Reaktionen lag nach DEAE-Behandlung des Rohextraktes keinerlei meßbare Enzymaktivität vor. Diese konnte erst durch Zugabe von Flavodoxin oder Ferredoxin wiedergewonnen werden. Dabei verhielten sich Normaleisen- und Eisenmangel-Extrakte grundsätzlich gleich. Die Effektivität des Flavodoxins in der phosphoroklastischen Pyruvat-Spaltung eines Extraktes aus C. pasteurianum wurde ebenfalls untersucht. Zu den in vitro durchgeführten Experimenten wurden stets carrierfreie Enzym-Rohpräparate aus normalen und eisenfreien Kulturen eingesetzt.

3.4.1. Einfluß von Ferredoxin und Flavodoxin auf die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase von C. pasteurianum

Diese, bereits bei der Anreicherung beschriebene, Reaktion wurde in einem Ferredoxin-freien Extrakt aus regulär gewachsenen C. pasteurianum-Zellen verfolgt. Das als Reaktionsprodukt auftretende Acetylphosphat konnte erst nach Zugabe von Ferredoxin oder Flavodoxin zum Testansatz gemessen werden. In Abb. 26 ist die unterschiedliche Effektivität der beiden Elektronentransport-Proteine anhand der Acetylphosphat-Produktion dargestellt.

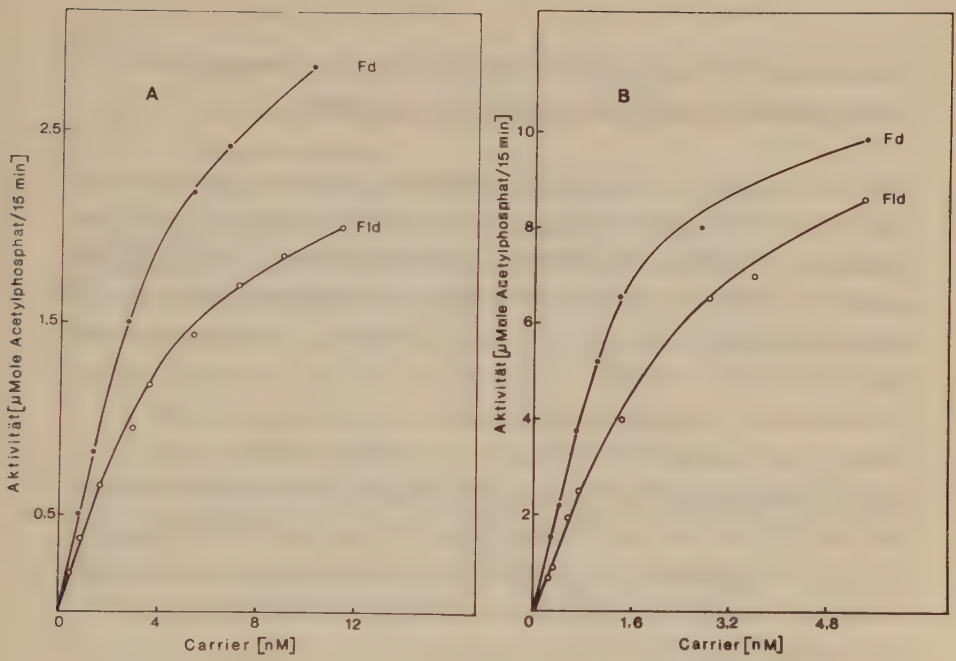


Abb. 26 Einfluß von Ferredoxin und Flavodoxin auf die Phosphoroklastische Reaktion in Gegenwart von MET und GSH

A) Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1,1 ml: KPO_4, pH 6,5, 25 mM; CoA, 0,04 mM; Pyruvat, 50 mM; Fd-freier Extrakt (MET), 10,5 mg; Fd und Fld wie oben angegeben. Die Reaktion wurde nach 15 Min. durch Zugabe von 1 ml 2 M Hydroxylaminlösung gestoppt und 3 ml $FeCl_3$-Reagenz zugegeben.

B) Es gelten die unter A beschriebenen Angaben. Die Präparation des Fd-freien Extraktes erfolgte in Gegenwart von GSH.

Die Acetylphosphat-Produktion konnte durch steigende Carrier-Konzentrationen erhöht werden. Sie verlief sowohl in Gegenwart von MET als auch GSH bis zu einer Konzentration von 5 nMolen Carrier je Testansatz linear (Abb. 26). In einem vorhergehenden Abschnitt (3.2.1.) wurde bereits die

stimulierende Wirkung des GSH erwähnt, die auch hier etwa das 5fache der in Gegenwart von MET erreichten Aktivität betrug.

Flavodoxin konnte in dieser Reaktion Ferredoxin ersetzen, wenn auch mit verminderter Aktivität. Im Sättigungsbereich (25 nMole Carrier) erreichte äquimolares Flavodoxin 67 % der Ferredoxinaktivität (MET) und 87 % in Gegenwart von GSH. Glutathion förderte somit die Gesamtaktivität beider Elektronentransportproteine, wobei Flavodoxin in höheren Konzentrationen stärker als Ferredoxin stimuliert wurde. Wie aus Abb. 26 ersichtlich, waren zur Bildung von 1 µMol Acetylphosphat pro 15 min 8 nMole Fd oder 14 nMole Fld notwendig (MET). In Gegenwart von GSH genügten bereits 0,9 nMole Fd bzw. 1,5 nMole Fld zur gleichen Syntheserate. Im Bereich der linearen Pyruvat-Spaltung (5 nMole Fd oder Fld) erreichte Flavodoxin etwa 68 % der Ferredoxinaktivität. Die Flavodoxin-Aktivität von C. pasteurianum betrug unter gleichen Testbedingungen nur 40 % der Aktivität äquimolaren Ferredoxins (KNIGHT und HARDY, 1966).

3.4.2. Einfluß von Ferredoxin und Flavodoxin auf die Hydrogenase-Reaktion in C. kluyveri

Das Enzym Hydrogenase katalysiert reversibel die Oxidation von reduziertem Ferredoxin. Wasserstoff ist bei dieser Reaktion entweder Elektronen-Donator oder das Produkt der Reduktion von Protonen ($H_2 \rightleftharpoons 2\,H^+ + 2e^-$). Hier wurde die Aktivität der Hydrogenase und damit die des Flavodoxins und Ferredoxins anhand der Wasserstoffaufnahme bestimmt (siehe 3.2.1.).

Da die Hydrogenase selbst zur Klasse der Eisen-Schwefel-Proteine gezählt wird, bestanden unter Eisenmangel auch für dieses Enzym limitierende Bedingungen. Es wurde daher zunächst die Aktivität der Hydrogenase in Normal-Zellen und Eisenmangel-Zellen bestimmt. Die Tabelle 12 gibt die spezifische und prozentuale Aktivität der Hydrogenase in beiden Extrakten

wieder.

Tab. 12 Spezifische Aktivität der Hydrogenase in Normaleisen- und Eisenmangel-Zellen

Hydrogenase-Präparat	µl H_2/Min.	µM H_2/Std./g Prot.	% Aktivität
Fe(+)	10,8	1 277	100
Fe(-)	5,5	608	48

Der Testansatz enthielt: Fe(-)Extrakt 24 mg; Fe(+)Extrakt 23 mg; Tris-HCl, pH 6,5, 40 mM; LDH 7,8 U; NAD 3,3 mM; Pyruvat 13,3 mM; GSH 13,3 mM; Zentralgefäß: 0,2 ml 20 %ige KOH.

Fe(+) = Normal-Eisen-Extrakt; Fe(-) = Eisenmangel-Extrakt.

Wurde den Extrakten in parallelen Ansätzen Flavodoxin bzw. Ferredoxin (3 nMole) zugegeben, so konnte keine Erhöhung der H_2-Aufnahme festgestellt werden. Ohne Einfluß blieb ebenfalls die Zugabe von "boiled extract" (siehe 2.29.1.1.). Dies ließ auf eine Sättigung der Extrakte an Elektronentransport-Carriern und anderen Cofaktoren schließen. Erst die Zugabe von Fe(+)-Hydrogenase zur Eisenmangel-Hydrogenase bewirkte eine drastische Steigerung der Aktivität des Fe(-)Enzyms.

Die Hydrogenase-Aktivität der bei Eisenmangel gewachsenen Zellen betrug etwa 50 % gegenüber der von Normalzellen (Tab. 12). Da hier beiden Extrakten jeweils nur ihre in vivo "zuständigen" Carrier zugegeben wurden (Eisenmangel = Fld; Normal = Fd), war es zunächst denkbar, daß Flavodoxin eine geringere Affinität zur Hydrogenase besaß. Setzte man eine, gegenüber dem Normal-Enzym unveränderte Hydrogenase voraus, sollte durch Zugabe von Ferredoxin wieder die ursprüngliche Aktivität (100 %) erlangt werden. Hierzu wurden Carrier-freie Extrakte aus Normaleisen- und Eisen-

mangel-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ferredoxin und Flavodoxin versetzt und die Hydrogenase-Aktivität (=Carrieraktivität) ermittelt.

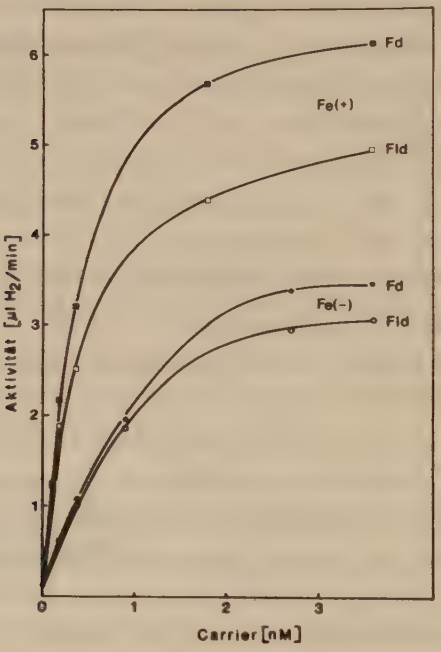


Abb. 27 Einfluß von Ferredoxin und Flavodoxin auf die Hydrogenase in Normal- und Eisenmangel-Extrakten

Der Testansatz enthielt: Pyruvat 13,3 mM; NAD 3,3 mM; LDH 7,8 U; Tris-HCl, pH 7,8, 40 mM; GSH 13,3 mM; Fd oder Fld 0 - 3,6 nMole; Fe(-)Extrakt 13 mg; Fe(+)Extrakt 12 mg; Zentralgefäß: 0,2 ml 20 %ige KOH. Die dargestellten Kurven geben die gemittelten Werte von 3 Testreihen wieder.

Wie aus Abb. 27 ersichtlich, waren die Carrier-freien Extrakte praktisch zu keinerlei Wasserstofftransport befähigt und erlangten erst durch Ferre-

doxin und Flavodoxin ihre Aktivität. Flavodoxin konnte Ferredoxin, wenn auch mit geringerer Effektivität, ersetzen. Im Normaleisen-Hydrogenase-präparat erreichte Flavodoxin 80 %, im Eisenmangel-Extrakt 89 % der Ferredoxinaktivität. Dieses Verhältnis bestand sowohl im proportionalen Bereich als auch bei höheren Konzentrationen. Experimente, bei denen die 10fachen der hier verwendeten Maximalkonzentrationen eingesetzt wurden, ergaben jeweils identische Aktivitäten des Flavodoxins und Ferredoxins. Die in Fe(-)Extrakten beobachtete höhere Aktivität des Flavodoxins gegenüber der Flavodoxinaktivität in Normal-Extrakten (bezogen auf 100 %) trat demnach nur bei niederen Konzentrationen auf.

Beim Vergleich der Carrieraktivität im Sättigungsbereich beider Extrakte, ergab sich eine 60 %ige Aktivität des Eisenmangel-Extraktes gegenüber dem Normal-Extrakt. Die hier gemessene höhere Aktivität (Tab. 12: 50 %) ergab sich aus dem günstigeren pH (Optimum der Hydrogenase von C. kluyveri: 7,8; FREDRICKS und STADTMAN, 1965) und stimmte generell mit dem vorigen Experiment überein.

Aus diesen Resultaten wurde folgendes deutlich: bei der Hydrogenase-Reaktion konnte Ferredoxin von Flavodoxin mit 80 - 100 %iger Aktivität ersetzt werden. Die Gesamtaktivität wurde jedoch nicht von der Konzentration der Elektronentransportproteine begrenzt, sondern von der intakten Hydrogenase selbst. Da bei gleicher Konzentration an Normal-Hydrogenase und Eisenmangel-Hydrogenase und Carrier-Sättigung nur 60 % der regulären Aktivität erreicht wurde, konnte hier ein durch Fe-Mangel inkomplettes Enzym angenommen werden. Setzte man ein ähnliches Fe-Bedürfnis der C. kluyveri-Hydrogenase wie das der C. pasteurianum-Hydrogenase voraus (12 Fe-Atome/Mol Protein), ließ sich bei mangelhafter Fe-Zuführung die herabgesetzte Aktivität durch ein nicht voll aktionsfähiges Enzym erklären.

Da Ferredoxin und Flavodoxin an den gleichen Reaktionen beteiligt sind, schien es interessant, diesen Mechanismus anhand der Aktivität eines äqui-

molaren Ferredoxin-Flavodoxin-Gemisches zu untersuchen. Hierzu wurde ein Carrier-freies Hydrogenase-Präparat aus regulären Zellen hergestellt und steigende Konzentrationen eines Fd-Fld-Gemisches zugegeben. Es sollte untersucht werden, ob die Hydrogenase mit einem der beiden Carrier bevorzugt reagierte, oder ob sich die Aktivitäten der Elektronentransportproteine additiv oder gar synergistisch verhielten.

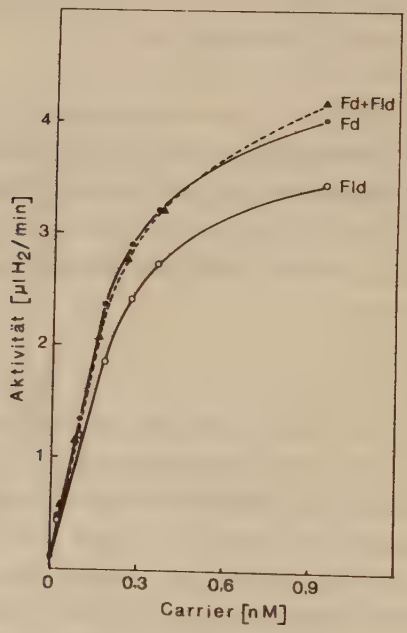


Abb. 28 Einfluß eines äquimolaren Ferredoxin-Flavodoxin-Gemisches auf die Hydrogenase von C. kluyveri

Es gelten die zur Abb. 27 beschriebenen Angaben. Fe(+)Extrakt 18,5 mg.

Die in Abb. 28 dargestellte Aktivität des Ferredoxins wurde als Bezugsgröße (100 %) gewählt; Flavodoxin erreichte 85 % dieser Aktivität. Das Fd-Fld-Gemisch erreichte im Sättigungsbereich 116 % gegenüber der Ferredoxin- und 135 % gegenüber der Flavodoxin-Aktivität. Die drei Reaktionen verliefen bis etwa 0,15 nMole Carrier linear. In diesem Bereich zeigten die Fd-Fld-Aktivitäten additive Raten. Die Meßwerte dieses Proportionalitätsbereiches sind zur Verdeutlichung in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Tab. 13 Einfluß eines Ferredoxin-Flavodoxin-Gemisches auf die Hydrogenase-Reaktion

nMole Fd oder Fld	Aktivität (μl H_2/Min.) Fd	Fld	Fd + Fld theoret.	Fd + Fld gemessen	% von theoret.
0,02	0,37	0,32	0,69	0,62	90
0,04	0,62	0,52	1,14	1,12	98
0,08	1,12	0,95	2,07	2,05	99
0,16	2,25	1,75	4,00	3,95 [1)]	98

Es gelten die für Abb. 27 beschriebenen Angaben. [1)] Durch Extrapolation ermittelt.

Aus der Tabelle 13 ging ein klares additives Aktivitätsverhalten des Fd-Fld-Gemisches gegenüber den einzelnen Carriern hervor. Die Aktivität des Gemisches entsprach jeweils genau der Summe der Einzelaktivitäten von Ferredoxin und Flavodoxin. Mit dem Übergang zum Sättigungsbereich (ab 0,15 nMole Carrier) verringerte sich die Aktivität des Gemisches simultan zur prozentualen Abnahme der Ferredoxin- und Flavodoxin-Proportionalität (Abb. 28). Aus diesen Resultaten ließ sich auf einen gleichen Wirkungsmechanismus der Hydrogenase mit den beiden Elektronentransport-Carriern

schließen. Dieses war erstaunlich, da Wasserstoff von beiden Carriern an völlig verschiedene Gruppen gebunden wurde (Ferredoxin : Fe-S; Flavodoxin : FMN). Unterschiedliche Mechanismen hätten nicht-additive oder synergistische Aktivitäten gezeigt. Auf das, bei der phosphoroklastischen Pyruvatspaltung ebenfalls beobachtete, additive Verhalten eines Fd-Fld-Gemisches wird in der Diskussion näher eingegangen.

3.4.3. Wirkung von Ferredoxin und Flavodoxin auf die NAD(P)-Ferredoxin-Reduktasen von C. kluyveri

Clostridien können mit Hilfe ihrer Pyridinnukleotid-Reduktasen Wasserstoff von $NADH_2$ oder $NADPH_2$ auf Ferredoxin übertragen. Ferredoxin wiederum wird durch Freisetzung molekularen Wasserstoffs mittels der Hydrogenase regeneriert. Diese Reaktionen sind bei C. kluyveri und anderen Clostridien reversibel und vom H_2-Partialdruck abhängig (THAUER et al., 1969; JUNGERMANN et al., 1971). C. kluyveri besitzt NAD- und NADP-spezifische Reduktasen, von denen letztere eine höhere Aktivität gegenüber der NAD-Reduktase zeigt (HILLMER, 1972; v. HUGO, 1972).

Es sollte untersucht werden, mit welcher Effektivität Flavodoxin den Elektronenfluß von der Hydrogenase über die NAD(P)-Fd-Reduktasen zu NAD bzw. NADP katalysierte.

Die in Abb. 29 wiedergegebenen Aktivitäten zeigten, daß Flavodoxin in der NAD- und NADP-Fd-Reduktase eines regulären Extraktes nur 79 % der Aktivität des äquimolaren Ferredoxins erreichte. Die Aktivität der NADP-Fd-Reduktase lag bei beiden Elektronentransport-Proteinen um das dreifache höher als die entsprechende Aktivität der NAD-Fd-Reduktase.

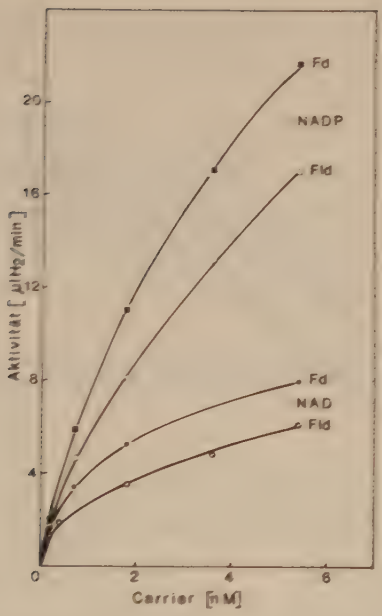


Abb. 29 Einfluß von Ferredoxin und Flavodoxin auf die NAD- und NADP-Ferredoxin-Reduktase

Die Experimente wurden in einer Warburg-Apparatur durchgeführt. Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 3,3 ml:

A) NAD-Fd-Reduktase: KPO_4, pH 7,5, 60 mM; Fd-freier Extrakt 23 mg; Fd oder Fld 0 - 5,4 nMole; α-Keto-Glutarat 12 mM; Glutamat-Dehydrogenase 0,04 mg; Ammoniumacetat 6 mM; NAD 1,4 mM.

B) NADP-Fd-Reduktase: KPO_4, pH 7,5, 60 mM; Fd-freier Extrakt 23 mg; Fd oder Fld 0 - 5,4 nMole; NADP 1,4 mM; Glutathion (ox.) 5 mM; Glutathion-Reduktase 0,02 mg.

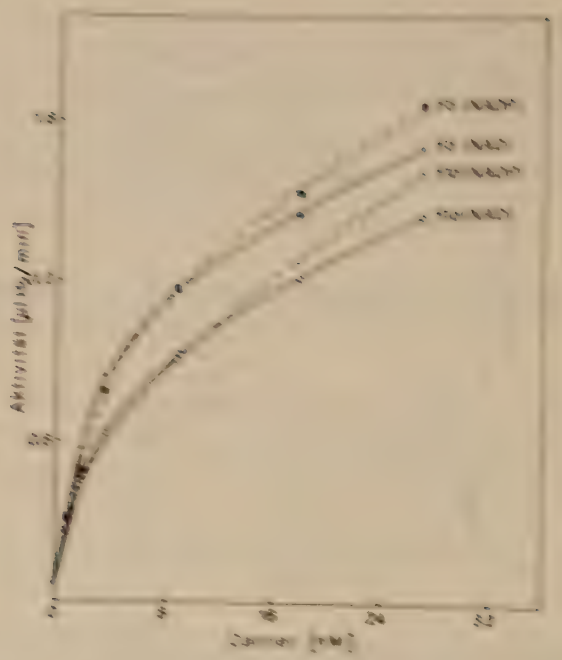


Abb. 30 Einfluß von Pyruvatkonz. und Pyruvatkonz. auf die NADPH-Pyruvat-Reduktase eines Eisenmangel-Präparates

Es gelten die in Abb. 29 angegebenen Daten. 0,1 m-linearer Extinktion 0 mg, pH 7,4 oder 7,0 (2 - 22 mMole).

Wurde ein optimaler Gehalt an Eisenmangel-Zellen eingestellt, so betrug die Aktivität des Pyruvatkinase bei beiden Pyruvat-NADPH-Reduktasen etwa 85 % der einer isolierten Pyruvatkinase-Präparation. Die insgesamt geringere Aktivität gegenüber der Normalzellen-Enzyme war zum Teil auf den niedrigeren Proteingehalt des eingesetzten Enzyms zurückzuführen.

Auffallend war jedoch die starke kinetische Hemmung der NADPH- und NADPH-Reduktase (Abb. 30). Die in einem regulären Extrakt gemessenen Reaktions

sen besaßen ein Aktivitätsverhältnis NAD-Red. : NADP-Red. von 1 : 3. In diesem Eisenmangel-Extrakt betrug dieses Verhältnis 1 : 1.

JUNGERMANN et al. (1971) hatten gezeigt, daß es sich bei diesen Reduktasen um zwei verschiedene Enzyme handelte, die auch einer unterschiedlichen Regulation gehorchten (THAUER et al., 1971). Die NADP-Fd-Reduktase schien demnach unter Fe-Mangel-Bedingungen, ähnlich der Hydrogenase, einer partiellen Inaktivierung zu unterliegen.

3.4.4. Einfluß von Ferredoxin und Flavodoxin auf die Pyruvat-Synthese in C. kluyveri

Die Pyruvat-Synthese in C. kluyveri erfolgt durch reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA (STERN, 1965; ANDREW und MORRIS, 1965; GOTTSCHALK und CHOWDHURY, 1969):

$$\text{Acetyl-CoA} + Fd_{red}^{2-} + 2\,H^+ + HCO_3^- \longrightarrow \text{Pyruvat}^- + \text{CoA} + Fd_{ox} + H_2O$$

Es sollte untersucht werden, ob reduziertes Flavodoxin ebenfalls als Elektronendonator für diesen Ferredoxin-abhängigen Enzymkomplex fungieren konnte. Die Aktivität der Pyruvat-Synthase und die der Elektronencarrier wurde anhand des inkorporierten $^{14}CO_2$ nach GOTTSCHALK und CHOWDHURY (1969) gemessen. Bei dieser Methode wurde nicht nur das primäre Reaktionsprodukt, sondern die Gesamt-Radioaktivität des Pyruvats und der davon ausgehenden Biosyntheseprodukte erfaßt.

Tab. 14 Einfluß von Ferredoxin und Flavodoxin auf die reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA

Ferredoxin oder Flavodoxin ($\times 10^{-10}$ Mole)	$^{14}CO_2$ inkorporiert							
	Fe(+) Extrakt				Fe(-) Extrakt			
	Ferredoxin		Flavodoxin		Ferredoxin		Flavodoxin	
	cpm/Test	U/g Prot	cpm/Test	U/g Prot	cpm/Test	U/g Prot	cpm/Test	U/g Prot
0	122	-	100	-	100	-	102	-
0,072	1 122	0,064	952	0,054	285	-	275	-
0,18	3 250	0,18	2 590	0,149	343	-	332	-
7,2	18 800	1,08	15 792	0,912	425	0,014	385	0,013
18	55 530	3,20	44 517	2,56	768	0,025	698	0,023
180	206 735	11,93	188 995	10,91	3 354	0,112	3 207	0,107

Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 2 ml: Fe(+)Extrakt 3,08 mg (Fd-frei); Fe(-)Extrakt 5,32 mg (Fld-frei); $KH^{14}CO_3$ (281 200 cpm/µMol) 10 mM; KPO_4, pH 7,0, 50 mM; MET 25 mM; Acetylphosphat 25 mM; Coenzym A 0,5 mM; $NADH_2$ 2,5 mM; LDH 100 µg; Fd oder Fld 0 - 18 nMole; Gasphase H_2.
U = µMole/min; cpm = Impulse/min.

Im Fe(+)Extrakt wurden mit $NADH_2$ als terminalen Elektronendonator bei der höchsten eingesetzten Carrierkonzentration in Gegenwart von Ferredoxin 73 % der Radioaktivität in nichtflüchtige Komponenten eingebaut (Tab. 14). Mit Flavodoxin als Elektronencarrier wurden 67 % des $^{14}CO_2$ fixiert. Flavodoxin erreichte damit 91 % der Ferredoxinaktivität. Bei niedrigeren Konzentrationen betrug die durchschnittliche Aktivitätsdifferenz etwa 19 %.

Einen bemerkenswerten Aktivitätsverlust erfuhr die Pyruvat-Synthase in Eisenmangel-Extrakten. Flavodoxin konnte hier Ferredoxin zwar mit einer durchschnittlichen Aktivität von 94 % gegenüber Fd ersetzen. Die spezifische Aktivität der Fe(-)Pyruvat-Synthase betrug jedoch nur etwa 1 % der des Normal-Enzyms bei höchster Carrierkonzentration.

STERN (1965) fand, daß diese Reaktion bei C. kluyveri ein divalentes Kation benötigte, bei dem Mangan neben Cobalt eine stimulierende Wirkung zeigte. Die Abhängigkeit von Eisen war wenig ausgeprägt und an das Vorhandensein von Ferredoxin gebunden. Da zum Fe(-) Extrakt Ferredoxin bzw. Flavodoxin zugegeben wurde und Mn^{++} in ausreichender Konzentration vorlag, konnten diese Faktoren als Ursache für die geringe Enzymaktivität ausgeschlossen werden. Da aber C. kluyveri in der Lage war, bei Fe-Mangel zu existieren, mußte der Zelle genügend Pyruvat zur Verfügung stehen. Dies konnte einmal mit der bei Eisenmangel ausreichenden, in Gegenwart von Eisen jedoch im Überschuß vorhandenen Enzymaktivität erklärt werden. Weiterhin war unter diesen Bedingungen ein anderer Reaktionsweg möglich (Synthese aus C_2-Körpern), der bei dieser Methode nicht erfaßt wurde.

3.5. Orangerotes Protein

Bei der Anreicherung von Flavodoxin aus Zellen, die unter Eisenmangel-Bedingungen gewachsen waren, wurde bei den letzten Schritten (Ammoniumsulfat-Fraktionierung) ein orangerotes Protein abgetrennt. Dieses Protein

war offensichtlich einen Komplex mit Flavodoxin eingegangen, dessen Bindung erst durch hohe Salzkonzentrationen und sauren pH gelöst werden konnte. Da Komplexe zwischen Proteinen stets sinnvoller Natur sind, schien es interessant, diese Komponente näher zu charakterisieren, um Hinweise auf die physiologische Wirkung zu erhalten. Ein "sinnvoller" Komplex mit Flavodoxin wäre z. B. eine NAD(P)H-Dehydrogenase oder ein anderes spezifisches Elektronentransportprotein.

MAYHEW und MASSEY (1971) isolierten aus P. elsdenii unter Fe(-)-Bedingungen ein orangerotes Protein, das sie als NADH-Dehydrogenase identifizieren konnten. Der orangerote Chromophor dieser Dehydrogenase erwies sich als ein Gemisch aus FAD und in 6- bzw. 8-Stellung hydroxiliertem FAD (6-OH-FAD, 8-OH-FAD). Dieser modifizierte Isoalloxazinring wurde auch im Elektronentransport-Flavoprotein (ETF) des gleichen Bakteriums nachgewiesen (WHITFIELD und MAYHEW, 1973). Da sich P. elsdenii und C. kluyveri, wie bereits erwähnt, in verschiedenen physiologischen Merkmalen ähnlich waren, wurde das orangerote Protein von C. kluyveri als analoges Protein (NADH-Dehydrogenase, ETF) angesehen.

In dieser Arbeit wurde zunächst die physikalisch-chemische Untersuchung dieses Proteins vorgenommen, um hierdurch schon Aussagen über den physiologischen Charakter machen zu können.

In Abb. 31 Kurve (1) ist das Absorptionsspektrum dieses Proteins dargestellt, das die Charakteristika eines Flavoproteins beinhaltete (vergleiche Abschnitt 3.3.7.). Die Maxima lagen bei 272 nm (nicht eingezeichnet), 310 nm, 325 nm, 360 nm und 475 nm, Schultern zeigten sich bei 260 nm, 290 nm, 425 nm, 450 nm, 510 nm und 550 nm. Bei Behandlung des Proteins mit TCA erfolgte die Denaturierung des Proteins und, als weiterer Hinweis auf ein Flavoprotein, die Dissoziation des Chromophors. Die Methode entsprach der FMN-Dissoziation von Flavodoxin.

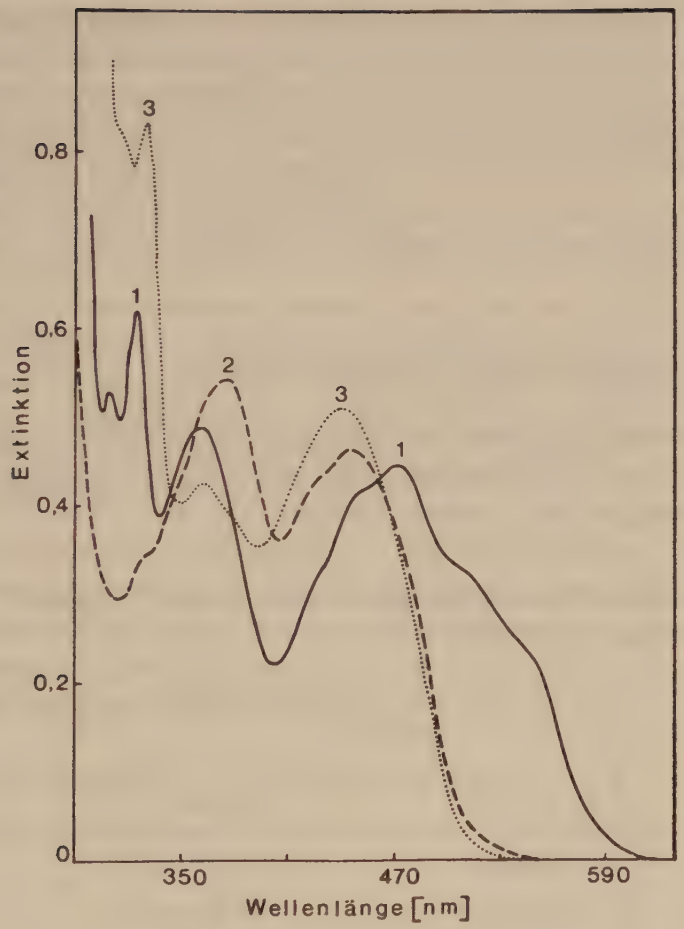


Abb. 31 Absorptionsspektren des nativen orangeroten Proteins und des Chromophors

(1) orangerotes Protein in 50 mM KPO_4, pH 7,3 (orangerot)

(2) orangerotes Protein in 50 mM KPO_4, pH > 7,0 (grün)

(3) TCA-dissoziierter Chromophor, mit K_2HPO_4 neutralisiert (gelb).

Methode der TCA-Dissoziation siehe 2.23.1.

Bei Änderung des pH zum alkalischen Bereich trat ein Farbumschlag der Proteinlösung von orangerot zu grün ein (Abb. 31 Kurve (2)). Die Absorptionskurve dieser Lösung zeigte einen deutlich geänderten Verlauf: die Maxima bei 310 nm und 325 nm verschwanden und eine Verschiebung der Hauptpeaks zu 375 nm und 445 nm trat ein. Die Absorption ab 510 nm zum langwelligen Bereich war drastisch gesenkt. Die in Kurve (3) dargestellte Absorption des neutralisierten Chromophors zeigte Maxima bei 330 nm, 360 nm und 440 nm.

3.5.1. Prosthetische Gruppe des orangeroten Proteins

Der Chromophor konnte durch TCA-Behandlung abgetrennt werden. Die Identifizierung des Flavins erfolgte mittels Dünnschicht-Chromatographie in zwei Laufmitteln.

Tab. 15 Dünnschichtchromatographie der prosthetischen Gruppe des orangeroten Proteins

Flavin	Laufmittel 1	Laufmittel 2
	Rf-Werte	Rf-Werte
FAD	0,377	0,352
Probe	0,412	0,395
FMN	0,594	0,545
Riboflavin	0,230	0,603

Laufmittel 1) 5 % Na_2HPO_4 in H_2O
2) n-Butylalkohol-Essigsäure-H_2O (4 : 3 : 3; v/v/v)
Dünnschicht-Cellulose-Platten (Merck)

Die Ermittlung der Rf-Werte erbrachte keine eindeutige Aussage. Mit Sicherheit sollten Riboflavin und FMN als in Frage kommende Flavine ausscheiden. Die Probe zeigte Ähnlichkeit zu FAD aber keine absolute Übereinstimmung der Mobilitätswerte. Das Resultat ließ, im Einklang mit der NADH-Dehydrogenase - ETF - prosthetischen Gruppe, ein Gemisch aus FAD und modifiziertem FAD vermuten.

Der orangefarbene Chromophor der NADH-Dehydrogenase von P. elsdenii zeigte die charakteristische Absorption des 8-OH-FAD (7-Methyl-8-Hydroxy-10-(Ribityl-5'-ADP)-Isoalloxazin) mit Maxima bei 475 nm, 320 nm und eine Schulter bei 510 nm. Die Maxima des 6-OH-FAD (6-Hydroxy-7,8-Dimethyl-10-(Ribityl-5'-ADP)-Isoalloxazin) lagen bei 358 nm und 425 nm (GISHLA und MAYHEW, 1973; WHITFIELD und MAYHEW, 1974). Die Farbe des 6-OH-FAD war pH-abhängig: in saurem pH infolge Protonation gelb und im alkalischen pH durch Ionisation grün (MAYHEW et al., 1974). Diese Resultate standen in absoluter Übereinstimmung mit den hier gefundenen Ergebnissen. Die in Abb. 31 dargestellte pH-Abhängigkeit der Absorptionseigenschaften (grün ⟷ gelb) und die Maxima des orangefarbenen Proteins hatten demnach folgenden Ursprung:

Maxima (Schulter) (nm)	Flavin
325	8-OH-FAD
360	6-OH-FAD
425	6-OH-FAD
450	FAD
475	8-OH-FAD
510	8-OH-FAD
550	8-OH-FAD

WHITFIELD und MAYHEW (1974) ermittelten in der NADH-Dehydrogenase ein Verhältnis 8-OH-FAD zu 6-OH-FAD von etwa 3 : 1. Durch Vergleiche

beider Absorptionsspektren konnte für das C. kluyveri-Protein ein höherer Anteil an 6-OH-FAD angenommen werden.

Orangeroter Protein-Flavodoxin-Komplex

Der Komplex dieser beiden Proteine zeigte deutlich die Anteile der modifizierten Flavine.

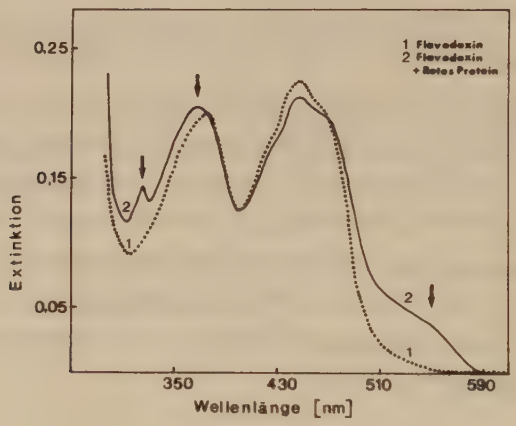


Abb. 32 Spektren eines Flavodoxin-orangeroten Protein-Gemisches

(1) homogenes Flavodoxin

(2) Gemisch aus Flavodoxin und orangerotem Protein (1 : 1; w/w)

In Abb. 32 ist der Verlauf des Flavodoxins dem einer Fld-orangeroten Protein-Mischung gegenübergestellt. Das Gemisch zeigte gegenüber Flavodoxin das Auftreten eines neuen Peaks (325 nm = 8-OH-FAD) und die Verschiebung des 375 nm-Peaks (FMN) zu 365 nm (6-OH-FAD). Die Absorption bei 445 nm war gesenkt und die Schulter bei 475 nm stärker ausgeprägt (8-OH-FAD). Das Auftreten einer breiten Absorptionsbande im Be-

reich von 510 - 550 nm beruhte ebenfalls auf der 8-OH-FAD-Absorption.

3.5.2. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des orangeroten Proteins

Das Protein besaß eine ausgeprägt orangerote Farbe, die ein 8-OH-FAD erkennen ließ. Unter UV-Licht zeigte es, in Übereinstimmung mit der NADH-Dehydrogenase aus P. elsdenii, eine gleichfarbige, für Flavoproteine ungewöhnlich kräftige Fluoreszenz. Da die Fluoreszenz proteingebundener Flavine im allgemeinen einem starken quenching unterworfen ist, wurden daher die Fluoreszenzeigenschaften des nativen Proteins und der prosthetischen Gruppe untersucht.

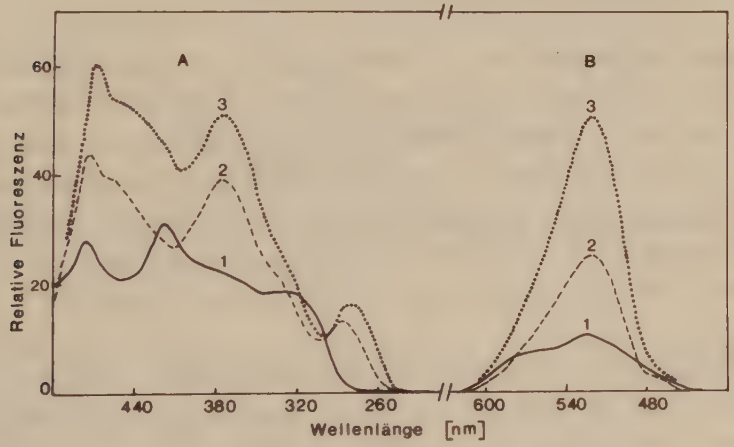


Abb. 33 Anregungs- und Emissionsspektren des orangeroten Proteins

A) Exciter-Spektren des nativen Proteins, pH 7,3 (1) und des Chromophors bei pH 7,3 (2) und pH < 7,0 (3).

B) Emissionsspektren der dazugehörigen Anregungsspektren.
(1) Exciter 476 nm; (2) Exciter 476 nm; (3) Exciter 470 nm.

Die Exciterspektren zeigten für das native Enzym (Abb. 33 (1)) Maxima bei 325 nm, 420 nm und 476 nm. Die Maxima des Chromophors waren nur im 476 nm-Peak identisch, die Peaks bei 375 nm, 280 nm und 290 nm (3) entsprachen den für Flavine typischen Werten. Die Emissionsspektren (Abb. 33 B) wiesen ein Maximum bei 530 nm für das native Protein und 525 nm für den Chromophor auf. Die dabei auftretende Fluoreszenzzunahme bei sauer werdendem pH war ein zusätzlicher Hinweis auf FAD, da die Fluoreszenz von FMN und Riboflavin mit sinkendem pH abnimmt (UDENFRIEND, 1962).

Die NADH-Dehydrogenase wies mit diesen Resultaten übereinstimmende Excitermaxima bei 480 nm, 375 nm und 325 nm und ein Emissionsmaximum bei 530 nm auf (MAYHEW und MASSEY, 1971).

3.5.3. Differenzspektren des Semichinon-Anions

Die NADH-Dehydrogenase von P. elsdenii wies bei Reduktion mit Na-Dithionit keinerlei Anzeichen einer Semichinonform auf (MAYHEW und MASSEY, 1971). Das orangerote Protein von C. kluyveri zeigte jedoch bei Na-Dithionit-Reduktion die für Flavoproteine ungewöhnliche Semichinon-Anionform, erkenntlich an der kräftigen Rotfärbung der Proteinlösung. Die Absorptionseigenschaften dieses roten Semichinons (neutrales Semichinon von Flavodoxin = blau) wurden anhand von Differenzspektren untersucht.

Das Differenzspektrum des Semichinon-Anions minus oxidierten Flavoproteins kreuzte bei 510 nm die Null-Achse. Das bedeutete, daß diese Extinktion weder in Wellenlänge noch Intensität verändert war. Dieser charakteristische Wert und die ab 510 nm - 690 nm auftretende Extinktionszunahme zeigten, im Gegensatz zum blauen neutralen Flavodoxin-Semichinon, die Gegenwart des roten Semichinon-Anions an. Identische Bildung dieser Semichinonform wurde vom ETF von P. elsdenii beschrieben (WHITFIELD und MAYHEW, 1974).

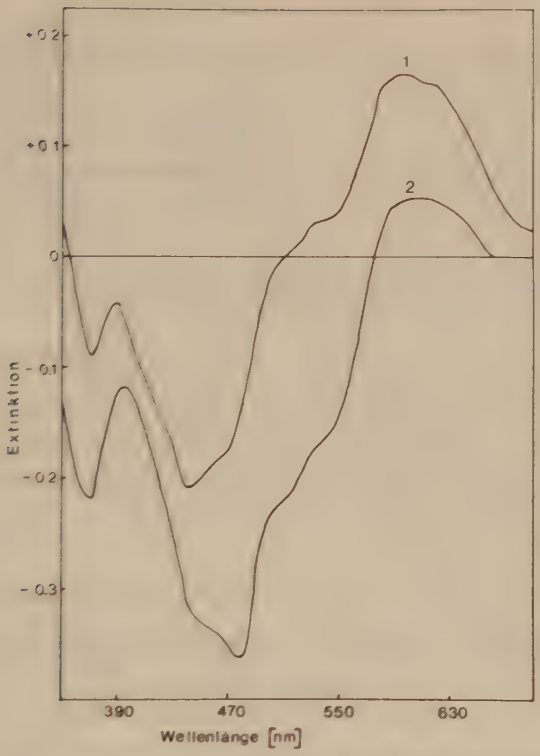


Abb. 34 Differenzspektren des orangefarbenen oxidierten Proteins und des Semichinon-Anions

Die Differenzspektren wurden in einem Pye-Unicam Doppelstrahlphotometer aufgenommen. Methode siehe 2.20.2.

(1) Semichinon minus oxidiertes Protein
(2) Reduziertes minus oxidiertes Protein

Die zur Klassifizierung von Flavoproteinen herangezogene Eigenschaft der Semichinonbildung (siehe 3.3.7.3.; MASSEY et al., 1969) schrieb das blaue neutrale Semichinon den Dehydrogenasen zu, die das rote Semichinonanion bildenden Proteine galten als Flavoprotein-Oxidasen. Bei prinzipieller Gültigkeit dieser Klassifizierung können dem orangefarbenen Fla-

voprotein von C. kluyveri demnach Oxidase-Eigenschaften zugesprochen werden.

Das reduzierte wies gegenüber dem oxidierten Protein positive Extinktion von 575 nm bis 660 nm auf und blieb schwach rötlich-grau gefärbt.

3.5.4. Anaerobe Photoreduktion des orangefarbenen Proteins

Da dieses Flavoprotein durch Bildung einer Semichinon- und Hydrochinonform offensichtlich zu einem Transport von 2 Elektronen befähigt war, sollte dies auch durch anaerobe Photoreduktion mit EDTA als Elektronendonator möglich sein. Hierzu wurde wie beim gleichen Experiment der Flavodoxinreduktion verfahren (siehe 3.3.7.4.).

Die durch Licht gesteuerte Reduktion des Flavoproteins ging wesentlich langsamer als die des Flavodoxins vonstatten. Die Peaks bei 360 nm und 475 nm nahmen gleichzeitig ab (Abb. 35), was eine gleichzeitige Reduktion des 6-OH-FAD (360 nm) und des 8-OH-FAD (475 nm) bedeutete. Die in (4) dargestellte Kurve repräsentierte die Absorption des roten Semichinon-Anions. Die Maxima lagen bei 355 nm und 510 nm,mit Schultern bei 385 nm, 550 nm und 630 nm. Das nach einer Beleuchtungszeit von 18 Stunden noch nicht vollständig reduzierte Protein (6) wies bei 350 nm, 420 nm und 510 nm Maxima und eine Schulter bei 610 nm auf. ETF von P. elsdenii zeigte ebenfalls nach 16stündiger Lichteinwirkung keine vollständige Reduktion (WHITFIELD und MAYHEW, 1974). Isosbestische Punkte traten während der Photoreduktion bei 353 nm, 489 nm und 510 nm auf, die das Vorhandensein einer homogenen Substanz anzeigten. Mit Na-Dithionit reduziertes orangefarbenes Protein wies bei 510 nm ebenfalls noch Absorption auf. Überschuß von Na-Dithionit führte zu Denaturierung des Proteins.

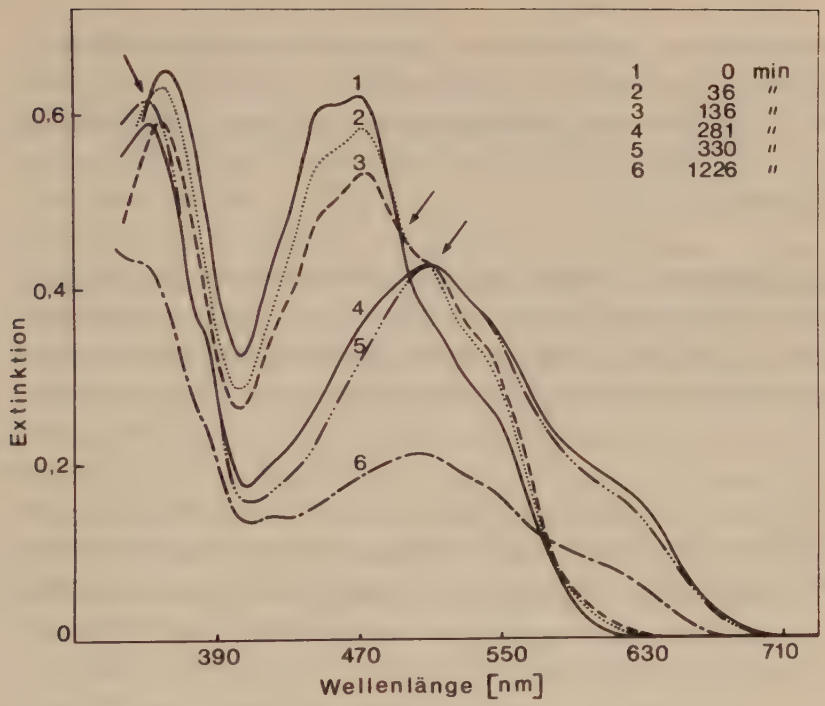


Abb. 35 Anaerobe Photoreduktion mit EDTA als Elektronendonator

Der Ansatz enthielt 150 mM Na-Acetat und 60 mM EDTA, pH 6,8 und Flavoprotein. Die Methode ist unter 2.22. beschrieben. Die Zeiten der Lichteinwirkung sind im Inset angegeben. Die Pfeile markieren isosbestische Punkte.

3.5.5. Biologische Aktivität des orangeroten Proteins

Die NADH-Dehydrogenase und ETF von P. elsdenii katalysieren die Oxidation von NADH zur Reduktion von künstlichen Farbstoffen (Diaphorase-Aktivität). Nur ETF vermag die Oxidation von NADH zur Reduktion von Butyryl-CoA-Dehydrogenase zu vollbringen. Beide Enzyme haben gleiches

Molekulargewicht, gleiche antigene Eigenschaften und übereinstimmende Aminosäurezusammensetzung. Daher postulierten WHITFIELD und MAYHEW (1974), daß NADH-Dehydrogenase ein modifiziertes ETF (oder umgekehrt) sei, identische Proteine, die sich nur durch ihre Flavingruppen unterscheiden.

Dem orangefarbenen Protein von C. kluyveri konnten hier analoge Eigenschaften zugeschrieben werden. Bei Einsatz dieses Proteins im Hydrogenase-Test eines Fe(-)Extraktes konnte Elektronentransport-Aktivität gemessen werden. Die Resultate ließen jedoch keine quantitativen Aussagen zu.

Ob dieses Flavoprotein, wie ETF bei P. elsdenii, den Elektronentransport zur Reduktion von Butyryl-CoA-Dehydrogenase mit nachfolgender Bildung von Butyryl-CoA bewerkstelligt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4. DISKUSSION

Bedeutung von Eisen im Stoffwechsel der Clostridien

Clostridium kluyveri wächst auf Äthanol, Acetat und Bikarbonat als alleinige Energie- und Kohlenstoffquellen und produziert Buttersäure, Capronsäure und Wasserstoff (BORNSTEIN und BARKER, 1948). Der Energieertrag dieser Gärung durch Substratstufenphosphorylierung ist gering und streng an die Ferredoxin-abhängige Freisetzung von überschüssigen Elektronen in Form von Wasserstoff gebunden (BARKER, 1956). Dabei ist bemerkenswert, daß die Wasserstoffbildung bei C. kluyveri nicht wie bei saccharolytischen Clostridien von der phosphoroklastischen Pyruvat-Spaltung ausgehen kann, da Pyruvat als katabolisches Zwischenprodukt nicht zur Verfügung steht. Die Ausgangsverbindungen sind hier reduzierte Pyridinnukleotide, die bei der Äthanol- und Acetaldehydoxidation entstehen. NAD(P)-Ferredoxin-Reduktasen katalysieren dann den Elektronentransfer auf Ferredoxin. Diese Ferredoxin-Reduktion durch Flavoprotein-Reduktasen und die nachfolgende Wasserstoff-Freisetzung werden (in zellfreien Extrakten) durch den Redoxgrad von $NAD^+/NADH$ reguliert (THAUER et al., 1969; JUNGERMANN et al., 1971).

Neben der Wasserstoffbildung kann reduziertes Ferredoxin auch in Biosynthesewegen als Elektronendonator fungieren. Die für die Pyruvatsynthese benötigte Reduktionskraft geht bei C. kluyveri wiederum von reduzierten Pyridinnukleotiden aus (GOTTSCHALK und CHOWDHURY, 1969).

C. kluyveri und andere Clostridien sind somit in anabolischen und katabolischen Stoffwechselwegen streng von einem Elektronencarrier mit niedrigem Redoxpotential (Ferredoxin) abhängig. Da Ferredoxin zu den non-hemeiron Proteinen zählt, bedingt dies zwangsläufig ein hohes Eisenbedürfnis dieser Bakterien. Eisenmangel-Bedingungen müssen sich somit signifikant auf die Synthese der eisenhaltigen Proteine auswirken und die davon abhän-

gigen Stoffwechselprozesse beeinträchtigen.

Den Bakterien bleiben aber mehrere Möglichkeiten, auf Eisenmangel-Bedingungen zu reagieren:

a) Die Umgehung der Stoffwechselreaktionen, an denen Ferredoxin beteiligt ist, z. B. durch Umstellung des Gärungsstoffwechsels.

b) Die Synthese eisenfreier Elektronenakzeptoren, die Ferredoxin in seiner Funktion ersetzen können.

c) Die Aufrechterhaltung eines minimalen Stoffwechsels mit Hilfe von Spuren noch vorhandenen Eisens für den Fall, daß die oben genannten Möglichkeiten für das betreffende Bakterium nicht realisierbar sind.

Experimente mit strikt und fakultativ anaeroben Bakterien lieferten entsprechende Beispiele. So reagierte C. welchii (= perfringens) auf Eisenmangel mit Umstellung seines Gärungsstoffwechsels. Die in Gegenwart von Eisen gebildeten Produkte Essigsäure, Buttersäure, Äthanol, CO_2 und H_2 wurden unter Eisenmangel-Bedingungen nur noch in Spuren synthetisiert; Hauptprodukt war nun Milchsäure (PAPPENHEIMER und SHASKAN, 1944). Pyruvat fungierte hier offensichtlich nicht mehr als Elektronendonator für die Wasserstoffproduktion sondern als Elektronenakzeptor. C. acetobutylicum reagierte unter Eisenmangel durch starke Herabsetzung der Butyrat-, Acetat- und Gasbildung in ähnlicher Weise. Neben Formiat war Lactat das überwiegende Gärprodukt (HANSON und RODGERS, 1946). Analoge Effekte traten bei fakultativ anaeroben Bakterien wie Aerobacter aerogenes und Aerobacter indologenes auf (WARING und WERKMAN, 1943). Das Wachstum dieser Organismen war eingeschränkt, wurde aber im Vergleich zu C. saccharobutyricum und C. sporogenes nicht unterbunden. Bei den zuletzt genannten Bakterien lagen unter Eisenmangel Enzyme wie Hydrogenase, Pyruvat-Dehydrogenase und Phosphotransacetylase nicht in meßbarer Aktivität vor (AUBEL, 1957).

Andere Clostridien wie C. pasteurianum oder Clostridium MP produzierten unter Eisenmangel dennoch Wasserstoff, die Produktbildung war qualitativ nicht verändert. Diese Bakterien waren in der Lage, statt Ferredoxin ein eisenfreies Ersatzprotein zu synthetisieren, das ersteres in seinen Funktionen ersetzen konnte.

Wurde C. kluyveri unter Eisenmangelbedingungen kultiviert, war eine Verminderung des totalen Substratverbrauchs und der Produktbildung bei Beendigung des Wachstums um durchschnittlich 20 % festzustellen. Der Stoffwechselumsatz einer Eisenmangel-Kultur pro Stunde betrug jedoch nur etwa 30 % der einer Normalkultur. Hieraus konnte man schließen, daß der Stoffwechsel bei Eisenmangel wesentlich langsamer vonstatten ging.

Die Analyse der Gärprodukte ergab keinerlei Hinweise auf eine qualitative Variation der Produkte wie z. B. bei C. welchii. Das Produktspektrum war mit dem einer Normalkultur identisch, beeinflußt war nur die Menge der pro Zeiteinheit gebildeten Gärungsprodukte und entsprechend das Wachstum. So konnte zunächst vermutet werden, daß C. kluyveri in die oben beschriebene Gruppe c) einzuordnen war, daß also ein minimaler Eisen-abhängiger Stoffwechsel ablief. Berücksichtigte man jedoch, daß C. kluyveri erst bei extrem niedrigen Eisenkonzentrationen durch Verminderung von H_2-Entwicklung, Substratumsatz und Wachstum reagierte, so war es aber auch denkbar, daß nun nicht mehr Ferredoxin, sondern ein anderes Eisen-Protein limitierend wirkte. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, daß bei C. kluyveri wie bei C. pasteurianum, Clostridium MP, Peptostreptococcus elsdenii und anderen anaeroben Bakterien, die Synthese von Flavodoxin anstelle von Ferredoxin als wichtigste Reaktion auf Eisenmangel-Bedingungen erfolgt war. Dies ermöglichte C. kluyveri, die Eisenspuren für Fe-Proteine aufzusparen, die nicht durch eisenfreie Proteine ersetzbar sind.

C. kluyveri ist damit nach C. pasteurianum und Clostridium MP das dritte Clostridium von dem bekannt ist, daß es Eisenmangel durch Synthese eisen-

freier Ersatzproteine ausgleicht. Die Entwicklung von Wasserstoff zeigte, daß die Hydrogenase noch funktionsfähig war. Durch Eisenmangel schien zunächst die Ferredoxin-Synthese unterbunden und die Flavodoxin-Synthese induziert zu werden. Das noch zur Verfügung stehende Eisen kann dann selektiv für nicht ersetzbare Enzyme verwendet werden.

C. kluyveri kann durch Mangel an Phosphofructokinase und geeigneten Pyruvat-abbauenden Enzymen keine Kohlenhydrate und kein Glycerin oder Pyruvat verwerten (DECKER et al., 1966). Betrachtet man das enge Substratspektrum, das dieser Organismus verwerten kann (Äthanol, Acetat, Crotonat), so scheint die Möglichkeit der Flavodoxin-Synthese für diesen hochspezialisierten Organismus für die wechselnden Bedingungen in der Natur sehr nützlich zu sein.

Charakterisierung des Flavodoxins aus C. kluyveri

SMILLIE beschrieb 1965 ein Flavoprotein der blaugrünen Alge Anacystis nidulans, das Ferredoxin-Aktivität zeigte und unter Eisenmangel gebildet wurde. Seither wurden 12 dieser Flavodoxine isoliert. Die Flavodoxin-produzierenden Organismen gehören taxonomisch verschiedenen Gattungen an und reichen von fermentativen über aerobe und photosynthetische Bakterien bis hin zu blaugrünen Algen und Grünalgen. Tabelle 16 gibt eine Zusammenfassung aller bisher beschriebenen Flavodoxine an und spezifiziert, unter welchen Eisen-Bedingungen sie gebildet werden.

Die Tab. 16 zeigt, daß nur etwa die Hälfte der Flavodoxine bei Eisenmangelbedingungen gefunden wurde. In Gegenwart von Eisen gebildetes Flavodoxin kann nicht als Ersatz für Ferredoxin betrachtet werden; es erfüllt selbständige Funktionen bei normalen Wachstumsbedingungen, wie der N_2-Fixierung, Sulfitreduktion oder Photoreduktion von Chloroplasten. Flavodoxine unterscheiden sich von anderen Flavoproteinen durch ihr niedriges Redoxpotential und niedriges Molekulargewicht. Aufgrund ihrer Funktion

und biochemischen Merkmale werden sie zu den Dehydrogenasen gezählt. Sie besitzen generell übereinstimmende Charakteristika wie Molekulargewicht, Absorptionseigenschaften, prosthetische Gruppe und Aminosäurezusammensetzung, die sie von anderen Enzymen unterscheiden. Im folgenden wird das C. kluyveri-Flavodoxin den bekannten Flavodoxinen gegenübergestellt und versucht, es in eine bestehende Klassifizierung der Flavodoxine einzuordnen.

Tab. 16 Zusammenfassung bisher beschriebener Flavodoxine

Fermentative Bakterien	Fld gefunden bei:	Autoren
Clostridium pasteurianum	Fe (-)	KNIGHT, D'EUSTACHIO, HARDY (1966)
Clostridium MP	Fe (-)	MAYHEW (1971)
Peptostreptococcus elsdenii	Fe (-)	MAYHEW und MASSEY (1969)
Desulfovibrio gigas	Fe (+)	LeGALL und HATCHIKIAN (1967)
Desulfovibrio vulgaris	Fe (+)	DUBOURDIEU und LeGALL (1970)
Escherichia coli	Fe (+)	VETTER und KNAPPE (1971)
Klebsiella pneumoniae	Fe (+)	YOCH (1974)
Clostridium kluyveri	Fe (-)	
Aerobe Bakterien		
Azotobacter vinelandii	Fe (+)	LIN und BOTHE (1972); SHETNA (1966)
Photosynthetische Bakterien		
Rhodospirillum rubrum	Fe (-)	CUSANOVICH und EDMONDSON (1971)
Blaugrüne Algen		
Anacystis nidulans	Fe (-)	SMILLIE (1965); BOTHE et al. (1971)
Synechococcus lividus	Fe (+)	CRESPI et al. (1972)
Grünalgen		
Chlorella fusca	Fe (-)	ZUMFT und SPILLER (1971)

Für das Molekulargewicht des homogenen Flavodoxins wurde bei C. kluyveri ein Mittelwert von 20 100 Dalton gefunden. Die Werte der SDS- und Gelfiltrationsmethode waren nahezu identisch. Der durch Addition der Aminosäuremolekulargewichte ermittelte Wert lag etwas höher (21 500 Dalton), stimmte aber gut mit den ersteren überein. In Tab. 17 sind die Molekulargewichte aller Flavodoxine zusammengestellt.

Tab. 17 Molekulargewichte bisher bekannter Flavodoxine

Organismus	Molekulargewicht (Dalton)
Clostridium MP	13 800
E. coli	14 500
C. pasteurianum	14 600
P. elsdenii	15 000
D. gigas	16 000
D. vulgaris	16 000
A. nidulans	16 000
S. lividus	17 000
C. kluyveri	20 100
K. pneumoniae	21 000
C. fusca	22 000
R. rubrum	23 000
A. vinelandii	23 000

Abkürzungen: A. nidulans = Anacystis nidulans; A. vinelandii = Azotobacter vinelandii; C. = Clostridium; C. fusca = Chlorella fusca; D. = Desulfovibrio; E. = Escherichia; K. = Klebsiella; P. = Peptostreptococcus; R. = Rhodospirillum; S. = Synechococcus.

Autoren siehe Tab. 16.

Das Molekulargewicht des C. kluyveri Flavodoxins lag wesentlich höher als das der verwandten Spezies. Vergleiche der Ferredoxine mit den zugehörigen Flavodoxinen der oben angegebenen Organismen lassen ein Verhältnis der Molekulargewichte des Ferredoxin : Flavodoxin von etwa 1 : 2 erkennen. Da Ferredoxin von C. kluyveri bisher nicht charakterisiert wurde, ist hier eine solche Korrelation noch nicht möglich.

Allen Flavodoxinen gemeinsam ist die prosthetische Flavingruppe FMN (Riboflavin-5'-phosphat), die an das Apoprotein im molaren Verhältnis von 1 : 1 gebunden ist. FMN ließ sich bei C. kluyveri und allen anderen Flavodoxinen vom Apoprotein leicht durch Einwirkung von Hitze, Kaliumbromid, Na-Dodecylsulfat oder Trichloressigsäure abtrennen. Eine Ausnahme machte hier das C. pasteurianum Flavodoxin, dessen prosthetische Gruppe nur durch Na-Mersalyl oder Guanidin-HCl entfernt werden konnte: Hitzeeinwirkung und Behandlung mit Trichloressigsäure blieben erfolglos (KNIGHT und HARDY, 1966).

Die Rekonstitution von Flavodoxin ist durch das Zusammengeben äquimolarer Mengen von FMN und Apoprotein möglich. Das rekonstituierte Flavodoxin zeigte bei Desulfovibrio gigas das normale Absorptionsspektrum, aber nur 75 % der biologischen Aktivität des nativen Proteins (DUBOURDIEU und LeGALL, 1970). Ähnliche Befunde wurden beim Azotobacter Flavodoxin und Clostridium MP Flavodoxin beschrieben (D'ANNA und TOLLIN, 1971; EDMONDSON und TOLLIN, 1971; MAYHEW, 1971). Versuche dieser Art wurden beim C. kluyveri Flavodoxin nicht durchgeführt.

Da die Dissoziation des Flavodoxins durch starke Agenzien und seine anschließende Rekonstitution möglich war, stellte sich die Frage der Bindung des FMN an das Apoprotein. Bei C. kluyveri ergaben mit nativem Flavodoxin durchgeführte Analysen auf freie Sulfhydrylgruppen negative Resultate. Mit homogenem Flavodoxin (nativ) durchgeführte Aminosäurebestimmungen ließen ebenfalls keine Hinweise auf die Anwesenheit von Cystein (Halbcy-

stin) erkennen. Wurden die gleichen Analysen jedoch mit FMN-freiem Apoflavodoxin durchgeführt, konnte eine freie SH-Gruppe (= 1 Cysteinrest) nachgewiesen werden. Diese Resultate ließen auf eine Beteiligung der Cystein-SH-Gruppe an der FMN-Bindung schließen. Im Einklang damit standen die Befunde von KNIGHT und HARDY (1967) und MAYHEW (1971), die analoge Verhältnisse bei den Flavodoxinen von C. pasteurianum, Clostridium MP und Peptostreptococcus elsdenii beschrieben. Ähnliche Resultate wurden beim Escherichia coli Flavodoxin gefunden (VETTER und KNAPPE, 1971). Die Beteiligung von Cystein an der FMN-Bindung scheint demnach generell bei Flavodoxinen vorzuliegen. MAYHEW konnte 1971 durch Vergleiche zudem nachweisen, daß nur eine SH-Gruppe an der FMN-Bindung beteiligt ist, obwohl mehrere SH-Gruppen im Molekül vorhanden sein können (C. pasteurianum : 1 SH-, Clostridium MP : 2 SH-, Peptostreptococcus : 3 SH-Gruppen). Des weiteren scheinen Tryptophan und Tyrosin an der FMN-Bindung beteiligt zu sein (MAYHEW, 1971; RYAN und TOLLIN, 1973). Das FMN selbst ist dabei mit seiner Ribityl-phosphat-Gruppe am Apoprotein gebunden (MAYHEW, 1971; D'ANNA und TOLLIN, 1972).

Versuche am C. kluyveri Flavodoxin zeigten, daß durch Hitzeeinwirkung die Bindung des FMN gelöst wurde. Die ermittelte Halbwertstemperatur ($D_{T/2}$) dieser Dissoziation von 56,3° C, bei der ein Gleichgewicht von nativem und dissoziiertem Flavodoxin vorlag, deutete eine verhältnismäßig schwache Bindungsenergie an. Vergleichende Daten sind in der Literatur nicht beschrieben.

Flavodoxine zeigen das für Flavoproteine charakteristische Absorptionsspektrum mit Peaks bei etwa 272 nm, 375 nm und 445 nm. Dabei besitzt der "gelbe" Peak bei 445 nm, resultierend aus der starken Absorption im violetten und blauen Spektralbereich, die eigentliche Aussagekraft. Die Flavodoxine von Clostridium MP, Peptostreptococcus elsdenii und C. kluyveri absorbieren bei der gleichen Wellenlänge wie FMN (445 nm) während C. pasteurianum eine leichte Verschiebung zum kurzwelligen Bereich zeigt (443 nm). Alle

übrigen Flavodoxine weisen signifikante Rotverschiebungen auf, die von 452 nm bis 467 nm reichen. Dies gab den Anstoß zur Klassifizierung der Flavodoxine. Aufgrund ihrer Absorptions- und Zirkular-Dichroismus-Eigenschaften (CD-Spektren) stellten D'ANNA und TOLLIN (1972) dem "Pasteurianum-Typ" (C. pasteurianum, Clostridium MP, Peptostreptococcus elsdenii) den "Rubrum-Typ" gegenüber (alle übrigen Flavodoxine). Das C. kluyveri Flavodoxin kann aufgrund seiner optischen Eigenschaften dem "Pasteurianum-Typ" zugeordnet werden.

Tab. 18 Absorptionseigenschaften und Extinktionskoeffizienten

Organismus	Peak I (nm)	Peak II (nm)	ε Peak II (x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$)	Autoren
"Pasteurianum-Typ"				
C. pasteurianum	372	443	10,4	1
Clostridium MP	376	445	10,4	2
P. elsdenii	377	445	10,2	3
C. kluyveri	377	445	10,1	4
"Rubrum-Typ"				
A. vinelandii	372	452	10,6	5
K. pneumoniae	370	452	-	6
D. gigas	374	456	10,2	7
D. vulgaris	375	456	10,7	8
R. rubrum	376	460	11,2	9
C. fusca	379	464	10,0	10
S. lividus	373	464	8,1	11
A. nidulans	377	465	10,2	12
E. coli	370	467	8,2	13

5 = HINKSON und BULEN (1967); 1 - 4 und 6 - 13 siehe Tab. 16.

Innerhalb der Pasteurianum-Klasse ließ sich eine bemerkenswerte Analogie zu dem Peptostreptococcus elsdenii Flavodoxin erkennen. Zusammen mit dem Flavingehalt der Zellen (PEEL, 1958), der Anreicherungstechnik, der Flavodoxinausbeute und den optischen Eigenschaften stand das C. kluyveri Flavodoxin dem des Peptostreptococcus näher als den zwei Clostridien-Flavodoxinen. Desgleichen ergab sich eine größere Übereinstimmung des Extinktionskoeffizienten (445 nm) zu dem Peptostreptococcus Flavodoxin als zu den übrigen.

D'ANNA und TOLLIN (1972) vermuteten, daß die Zunahme der Extinktionskoeffizienten mit einer Zunahme der Wellenlänge des "450 nm"-Maximums einherging. Diese Theorie traf nur auf die bis dahin beschriebenen Flavodoxine zu. Die Flavodoxine von Chlorella fusca, Escherichia coli und Synechococcus lividus wiesen mit ihren hohen Wellenlängen-Maxima gleichzeitig auch die niedrigsten Extinktionskoeffizienten auf und widerlegten die oben dargelegte Vermutung.

TOLLIN konnte 1971 zeigen, daß strukturelle Eigenschaften und Redoxaktivitäten von Flavodoxinen durch Zirkular-Dichroismus-Analysen (CD-Spektren) zu erkennen sind. Die Zirkular-Dichroismus-Eigenschaften sind dabei vom Molekülbau (Chiralität) der Zentren in der engsten Umgebung der Flavingruppe abhängig. Der Isoalloxazinring des FMN ist optisch inaktiv. Alle Dichroismus-Banden sind somit durch die optisch aktive Ribityl-Seitenkette und die Proteinstruktur bedingt. Proteine mit ähnlichen enzymatischen Eigenschaften und molekularer Umgebung des Flavins weisen nahezu identische Dichroismus-Spektren auf (EDMONDSON und TOLLIN, 1971). Es zeigte sich, daß Flavodoxine untereinander die gleiche Zirkular-Dichroismus-Typologie aufwiesen. Dies sprach für eine gleiche Flavinbindung und Übereinstimmung sowohl der enzymatischen als auch der Redox-Eigenschaften. Im Gegensatz dazu zeigte die Ferredoxin-NADP-Reduktase - ebenfalls ein Flavoprotein - fast spiegelbildlichen Verlauf.

Die langwelligen Bandmaxima (>400 nm) sind sehr empfindliche Meßwerte für die molekulare Umgebung des Chromophors und entstehen in Flavoproteinen in erster Linie durch Wechselbeziehungen des Isoalloxazinringes mit anderen Seitenketten. Dies bedeutet, daß Unterschiede der "flavin-binding site" sich bei Flavoproteinen sehr deutlich in der langen Wellenregion abzeichnen würden.

Die Zirkular-Dichroismus-Klassifizierung beruht auf der Basis des Übergangs von der negativen in die positive Elliptizität. C. kluyveri Flavodoxin und die anderen der Pasteurianum-Gruppe kreuzen die Null-Linie bei 400 nm, die der Rubrum-Gruppe bei 440 nm. Dieser Unterschied der beiden Gruppen beruht auf der Verschiedenheit der Flavinumgebung, Reaktivität und Redoxeigenschaften. Durch die Unterschiede ist die Ionisationsfähigkeit des Flavins in seinen verschiedenen Redoxformen beeinflußt (Chinon, Semichinon, Hydrochinon) und so die Redoxaktivität reguliert (EDMONDSON und TOLLIN, 1971). Die Flavin-Protein-Wechselbeziehung spielt somit eine Schlüsselrolle in der Redoxfähigkeit der Flavodoxine.

Tab. 19 Zirkular-Dichroismus-(CD)-Peaks einiger Flavodoxine

R. rubrum	(+)/(-)Maxima:	487/ 457/ 430/ 392/ 350*
C. pasteurianum	"	472/ 443/ 425/ 380/ 340*
P. elsdenii	"	471/ 442/ 423/ 378/ 332*
C. kluyveri	"	471/ 444/ 421/ 376/ 331

* Daten von EDMONDSON und TOLLIN (1971)

Die bemerkenswerte Übereinstimmung des C. kluyveri Flavodoxin mit dem des Peptostreptococcus elsdenii ließ aufgrund der oben geschilderten Korrelationen zwischen Zirkular-Dichroismus-Profil, Konfiguration und Re-

doxeigenschaften eine generelle Analogie zu den Redoxeigenschaften der Pasteurianum-Gruppe annehmen. Das Redoxpotential (E'_o) des C. kluyveri Flavodoxins könnte demnach in der Größenordnung des Peptostreptococcus elsdenii Flavodoxins angenommen werden: Reduktion vom Chinon zum Semichinon - 115 mV; Reduktion vom Semichinon zum Hydrochinon - 372 mVolt, pH 7,0, 25° C (MAYHEW, 1971). Die Redoxpotentiale des C. pasteurianum und Clostridium MP Flavodoxins lagen in der gleichen Größenordnung (KNIGHT und HARDY, 1966; MAYHEW, 1971).

Flavodoxine besitzen einen Überschuß an den sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure. Während eine generelle Übereinstimmung der prozentualen Verteilung der geladenen Aminosäuren vorliegt (8 - 10 % basische (C. kluyveri: 8,3 %), 20 - 30 % saure Aminosäuren (C. kluyveri: 23,4 %)) treten Unterschiede hinsichtlich einzelner Aminosäuren auf.

Gemeinsames Merkmal der Pasteurianum-Gruppe ist das Fehlen des Histidins, während in der Rubrum-Gruppe 0 - 4 His-Reste gefunden wurden. Hier ist auch der Anteil der Cystein-Reste (1 - 5) höher als bei der ersten Gruppe.

Das Flavodoxin von C. kluyveri besitzt von allen Flavodoxinen den höchsten Glutaminsäure- und Methionin-Gehalt. In der Aciditätsreihe vom Rhodospirillum rubrum Flavodoxin bis zum Anacystis nidulans Flavodoxin nimmt das von C. kluyveri eine Mittelstellung ein.

Bei einigen Flavodoxinen wurde bereits die Aminosäuresequenz aufgeklärt. So bei den Flavodoxinen von C. pasteurianum (FOX et al., 1972), Desulfovibrio vulgaris (DUBOURDIEU et al., 1973) und Peptostreptococcus elsdenii (TANAKA et al., 1973). Die N-terminalen Sequenzen der Flavodoxine von Azotobacter vinelandii und Rhodospirillum rubrum sind ebenfalls bekannt (MACKNIGHT et al., 1974).

Tab. 20 Aminosäurezusammensetzung der Flavodoxine

	Pasteurianum-Gruppe				Rubrum-Gruppe							
	C.p.	C.m.	P.e.	C.k.	D.v.	D.g.	E.c.	S.l.	C.f.	R.r.	A.v.	A.n.
Lys	10	10	8	12	4	8	7	5	12	9	13	9
Try	4	4	4	4	1-2	1	6	3	4	3	4	6
His	0	0	0	0	1	0	3	1	4	1	0	0
Arg	2	2	2	4	6	3	3	4	4	8	6	2
Asp	18	17	16	16	20	17	13-14	22	28	25	21	28
Thr	4	5	8	4	6	9	6	8	14	16	8	8
Ser	14	8	7	13	7	8	4	4	11	11	15	12
Glu	19	21	18	29	17	18	16-17	25	22	16	23	26
Pro	4	4	5	4	4	6	3	4	5	7	5	3
Gly	17	14	14	27	19	14	11	19	25	28	21	19
Ala	14	6	18	21	18	15	11	15	24	20	15	12
CyS	1	3	2	1	5	5	3	2	5	2	1	1
Val	15	10	13	17	10	16	5	6	17	15	10	11
Met	4	5	5	7	0	2	1	1	4	2	1	1
Ile	5	15	5	8	9	5	9	12	9	10	6	13
Leu	12	8	7	14	13	14	10	12	18	22	20	13
Tyr	2	3	2	6	5	5	4	7	5	9	5	8
Phe	3	5	4	5	6	3	5	9	5	6	13	9
Total	148	140	138	192	152	149	122	154	216	210	187	154
Molekulargewicht	14600	16050	15000	20100	16000	16000	14500	17000	22000	22800	23000	21000
Autoren	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Abkürzungen: C.p. = Clostridium pasteurianum; C.m. = Clostridium MP; P.e. = **Peptostreptococcus elsdenii**; C.k. = Clostridium kluyveri; D.v. = Desulfovibrio vulgaris; D.g. = D. **gigas**; E.c. = **Escherichia coli**; S.l.= Synechococcus lividus; C.f.=Chlorella fusca; R.r.=Rhodospir.rubrum; A.v.=**Azotobacter vinelandii**; A.n. = Anacystis nidulans. Autoren: 1, 3 - 12 siehe Tab. 16, 2 = LUDWIG et al., 1971.

Flavine, und somit Flavodoxine, können als Redoxkatalysatoren zwei Elektronen aufnehmen oder abgeben. Sie sind so in der Lage, radikalische Reaktionen zu vollziehen, da sie durch zwei 1-Elektronenschritte reduziert oder oxidiert werden können. Die Reduktion bzw. Oxidation geht über eine stabile intermediäre Radikalform (Semichinon) vor sich. Das Semichinon kann durch einen 1-Elektronenschritt weiter reduziert oder oxidiert werden. Flavodoxine können daher Redoxreaktionen katalysieren, bei denen ein oder zwei Elektronen übertragen werden.

Flavodoxin von C. kluyveri unterlag bei Beleuchtung in Gegenwart eines Elektronendonators (EDTA) der anaeroben Photoreduktion. Die Reduktion verlief vom (gelben) Chinon über die (blaue) Semichinonstufe zum (farblosen) Hydrochinon. Bei der Untersuchung der Stöchiometrie dieser Reaktion zeigte die anaerobe Titration des Flavodoxins mit Na-Dithionit, daß 1 Mol Protein durch 1 Mol Na-Dithionit (= 2 Elektronen) reduziert wurde. Etwa 0,5 Mole Na-Dithionit ergaben maximale Semichinonbildung. Das bedeutete, daß Flavodoxin durch die Aufnahme eines Elektrons zum neutralen Semichinon reduziert wurde. Durch Aufnahme eines weiteren Elektrons (= 0,5 Mole Na-Dithionit) erfolgte die vollständige Reduktion zum Hydrochinon.

Analoge stöchiometrische Verhältnisse (Reduktion durch 2 Elektronen) wurden bei Clostridium MP (MAYHEW, 1971) und Peptostreptococcus elsdenii beobachtet (MAYHEW und MASSEY, 1969; MAYHEW et al., 1969). Dieser einfachen Stöchiometrie gehorchten nicht alle Flavodoxine. Das Flavodoxin von C. pasteurianum wurde von der Semichinonstufe zur völlig reduzierten Stufe nur durch Überschuß von Na-Dithionit (>1 Mol Na-Dithionit je Mol Protein) reduziert (MAYHEW, 1969). Das Semichinon des Azotobacter Flavodoxins konnte bei neutralem pH und niedriger Ionenstärke selbst durch großen Überschuß von Na-Dithionit nicht zum Hydrochinon reduziert werden (HINKSON und BULEN, 1967). Gleiches Verhalten zeigten die Flavodoxine von Rhodospirillum rubrum (CUSANOVICH und EDMONDSON, 1971)

und Anacystis nidulans (ENTSCH und SMILLIE, 1972). Wurde reduziertes Flavodoxin von C. kluyveri dem Luftsauerstoff ausgesetzt, so erfolgte eine sehr schnelle Bildung (4 Sekunden) des Semichinons und eine etwas langsamer verlaufende Weiteroxidation zum Chinon. Die stark ausgeprägte Flavodoxin-Autoxidation ist eine charakteristische Eigenschaft der Pasteurianum-Gruppe und wurde bei allen Angehörigen dieser Klasse beobachtet (MAYHEW et al., 1969; MAYHEW, 1971), während die Flavodoxine der Rubrum-Gruppe erheblich träger reagierten (>25mal langsamer). Die Reduktion und Autoxidation der Flavodoxine war pH-abhängig. Mit steigendem pH stieg ebenfalls die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl der Oxidation als auch der Reduktion bei beiden Flavodoxin-Gruppen. Dies zeigte, daß die Entfernung eines Protons von der Proteingruppe oder des Flavinmoleküls verantwortlich für die Reaktionsgeschwindigkeit war (EDMONDSON und TOLLIN, 1971). Beim C. kluyveri Flavodoxin betrug die Autoxidationszeit vom Hydrochinon zum Chinon bei pH 9,4 = 13 Sekunden, bei pH 5,6 = 20 Sekunden.

Das Redoxpotential der beiden Redoxschritte ist unterschiedlich. Während der Schritt vom Chinon zum Semichinon ein verhältnismäßig hohes Redoxpotential besitzt ($E'_o \sim$ -115 mV, pH 7; Peptostreptococcus elsdenii ≙ C. kluyveri) ist die Reduktion vom Semichinon zum Hydrochinon der eigentliche aktive Zustand des Flavodoxins ($E'_o \sim$ -372 mV, pH 7). Die Flavodoxine der Pasteurianum-Gruppe haben ein etwas höheres Redoxpotential als das Protein, dessen Ersatz sie darstellen (Ferredoxin: E'_o = - 420 mV, pH 7), liegen aber noch unterhalb des NADP/$NADPH_2$ (E'_o = - 320 mV, pH 7).

Biologische Aktivität des Flavodoxins von C. kluyveri

a) Hydrogenase

Die Ferredoxin-abhängige H_2-Bildung ist essentiell für den Stoffwechsel von C. kluyveri. Die dabei beteiligten wichtigsten Komponenten - Hydro-

genase und Ferredoxin - sind non-heme-iron Proteine. Diese haben bei C. pasteurianum 12 bzw. 8 Atome Fe/Mol Protein gebunden (CHEN und MORTENSON, 1974; MALKIN und RABINOWITZ, 1967). Überträgt man die Verhältnisse auf C. kluyveri, so ist bei Fe-Mangel nicht nur die Ferredoxin-Synthese unterbunden, sondern auch die Hydrogenase in ihrer Funktion eingeschränkt (GEST und GIBBS, 1952; PECK und GEST, 1957; NICHOLAS, 1958; TEMPERLI et al., 1960; NICHOLAS et al., 1960).

Im Normaleisen-Präparat erreichte Flavodoxin 80 % der Ferredoxin-Aktivität, in Eisenmangel-Hydrogenasepräparaten 89 %. Wie durch Experimente bewiesen werden konnte, verhielten sich die Ferredoxin- und Flavodoxin-Aktivitäten additiv. Das hieß, daß trotz unterschiedlicher prosthetischer Gruppe (Fe-S bzw. FMN) der Elektronentransport mit gleichem Wirkungsgrad verlief bzw. gleiche Affinität der Transfer-Gruppen vorlag. Die dennoch niedrigere Aktivität des Flavodoxins kann somit nur auf die unterschiedlichen Potentiale zurückzuführen sein (Ferredoxin: E'_o = - 420 mV; Flavodoxin: E'_o = - 372 mV). Das Redoxpotential des Flavodoxins beträgt so nur 88 % des Ferredoxin-Redoxpotentials. Damit wäre die bei der Hydrogenase-Reaktion nur 80 - 89 %ige Flavodoxinaktivität gut mit dem um den gleichen Prozentsatz erhöhten Redoxpotential zu erklären. Erwähnenswert ist hier noch die strenge Regulation dieser Reaktionsfolge. Die Primärprodukte der Äthanol- und Acetaldehydoxidation, reduzierte Pyridinnukleotide, werden durch Ferredoxin-NAD(P)-Reduktasen wieder oxidiert unter Reduktion des Ferredoxins (Flavodoxins). Diese Ferredoxin-Reduktion durch die NADP-Reduktase mit nachfolgender H_2-Freisetzung wird in zellfreien Extrakten von C. kluyveri durch die Redoxstufe von NAD^+/NADH reguliert. NAD^+ ist Aktivator, NADH ist Inhibitor (THAUER et al., 1969). Die Ferredoxin-Reduktion durch NAD-Reduktase wiederum wird durch Acetyl-CoA aktiviert und durch freies CoA gehemmt (JUNGERMANN et al., 1971).

b) Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

Gegenüber Ferredoxin konnte das C. kluyveri Flavodoxin die phosphoroklastische Pyruvatspaltung mittels einer Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Präparation aus C. pasteurianum mit 67 % in Gegenwart von Mercaptoäthanol und 87 % in Gegenwart von Glutathion (GSH) katalysieren. Eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Präparation aus C. kluyveri zeigte nur 5 % der C. pasteurianum Aktivität (STERN, 1965) und fand daher keine Verwendung. Unter gleichen Testbedingungen betrug die Flavodoxin-Aktivität von C. pasteurianum nur 40 % der Aktivität äquimolaren Ferredoxins (KNIGHT und HARDY, 1966). Identische Aktivität (40 %) beschrieben MAYHEW und MASSEY (1969) für das Peptpstreptococcus elsdenii Flavodoxin. Wie oben gezeigt wurde, ist die Flavodoxin-Aktivität stark durch SH-Reagenzien zu beeinflussen. Da die oben genannten Autoren den gleichen Test verwendeten, aber keine Angaben zu den SH-Reagenzien machten, kann die Aktivität der drei Flavodoxin-Präparate bei diesem Enzym nicht verglichen werden. In der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Reaktion zeigten die meisten der beschriebenen Flavodoxine biologische Aktivität. Nur die Flavodoxine von Azotobacter vinelandii und Klebsiella pneumoniae waren inaktiv.

c) NAD(P)-Ferredoxin-Reduktasen

HILLMER (1972) und v. HUGO (1972) zeigten, daß die Aktivität der NADP-Ferredoxin-Reduktase bei C. kluyveri das 3- - 10fache der NAD-Ferredoxin-Reduktaseaktivität betrug. Die Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Aktivität des Flavodoxins betrug nur 79 % der Aktivität äquimolaren Ferredoxins bei Fe(+)-Extrakten und 85 % bei Fe(-)-Präparaten, erklärbar ebenfalls durch die unterschiedlichen Redoxpotentiale der Elektronencarrier. Die NAD- und NADP-Ferredoxin-Reduktase zellfreier Extrakte aus Eisenmangelzellen wiesen jedoch identische Aktivität auf. Dies könnte einmal durch die Gegenwart von $NADH_2$ im Extrakt erklärt werden,

das die NADP-Ferredoxin-Reduktase hemmte. Wahrscheinlicher war, da unter Fe-Mangel beide Reduktasen Aktivitätsabnahme zeigten, daß die Reduktasen durch Fe-Limitierung in ihrer Funktion gehemmt waren, wobei die NADP-Ferredoxin-Reduktase stärker betroffen war und auf das Aktivitätsniveau der NAD-Ferredoxin-Reduktase abfiel.

d) Pyruvat-Synthase

Die Synthese von Pyruvat erfordert neben Acetyl-CoA und CO_2 die Anwesenheit eines reduzierten Elektronencarriers (GOTTSCHALK und CHOWDHURY, 1969). Die Aktivität der Pyruvat-Synthase erreichte bei Flavodoxin-Katalyse 91 % der Ferredoxin-katalysierten Reaktion. Dieser sehr hohe Wert ließ bei dieser Reaktion einen geringen Einfluß der unterschiedlichen Redoxpotentiale vermuten. Analoge Aktivität des Flavodoxins (94 %) wurde in Fe(-)-Extrakten ermittelt.

Überraschend war hier jedoch der ungewöhnliche Aktivitätsunterschied von Fe(+) und Fe(-) Enzympräparaten. Während der Hydrogenase bei Fe(-) 50 - 60 % ihrer Aktivität behielt und die NAD(P)-Ferredoxin-Reduktasen etwa 30 %, war bei der Pyruvat-Synthase nur eine Restaktivität von 1 % gegenüber der Fe(+) Pyruvat-Synthase zu messen. Hierfür kann folgende Erklärung gegeben werden:

Die Pyruvat-Synthase-Aktivität kann in Fe(+)-Zellen im Überschuß vorhanden sein und die geringe Aktivität in Fe(-)-Zellen den Erfordernissen genügen. Dafür spricht, daß bei Messung der Wachstumsparameter nicht der Effekt von "ruhenden Zellen" auftrat (d. h. Substratumsatz ohne Trockengewichtszunahme), sondern eine Zunahme der Zellsubstanz parallel zur Substratabnahme erfolgte. Dazu kommt, daß der Baustoffwechsel von C. kluyveri in der Gesamtstoffwechselbilanz nicht ins Gewicht fällt (1,3 Mol% Substrateinbau des Substratumsatzes, DECKER et al., 1970; JUNGERMANN et al., 1968) und die spezifische Aktivität der Pyruvat-Synthase in Fe(+)-

Zellen, auf ihre Funktion bezogen, sehr hoch erscheint. Die niedrige Fe(-)-Enzym-Aktivität könnte demnach, unter Einbeziehung der verlängerten Wachstumszeit, ihre quantitative Synthesefunktion hier voll erfüllen.

Orangerotes Flavoprotein

Zusammen mit Flavodoxin wurde ein orangefarbenes Flavoprotein isoliert, dessen charakteristische Farbe von der ungewöhnlichen prosthetischen Gruppe (6-OH-FAD und 8-OH-FAD) herrührte. Die gleichen Isoalloxazinderivate konnten als Komponenten der NADH-Dehydrogenase und des Elektronen-Transport-Flavoproteins (ETF) von Peptostreptococcus elsdenii und dem ETF aus Schweineleber erkannt werden (MAYHEW und MASSEY, 1971; GISHLA und MAYHEW, 1973; MAYHEW et al., 1974).

Wie WHITFIELD und MAYHEW (1973) nachweisen konnten, sind die Apoproteine der NADH-Dehydrogenase und des ETF identisch. Während jedoch der Chromophor der NADH-Dehydrogenase hauptsächlich aus 8-OH-FAD besteht und nur geringe Anteile FAD und 6-OH-FAD aufweist, setzt sich der Chromophor des ETF überwiegend aus FAD zusammen und zeigt nur einen geringen Anteil der Flavinderivate. Im Zuge der Charakterisierung des orangefarbenen Flavoproteins von C. kluyveri traten Übereinstimmungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften sowohl mit der NADH-Dehydrogenase als auch des ETF von Peptostreptococcus elsdenii auf. So zeigte der hohe Anteil von 8-OH-FAD mehr Verwandtschaft zum Chromophor der NADH-Dehydrogenase als zu dem des ETF. Das Auftreten der roten Semichinonanionform beim C. kluyveri Protein wiederum zeigte Übereinstimmung mit der des ETF. Die NADH-Dehydrogenase bildete kein Semichinon. Dies ließ den Schluß zu, daß es sich beim C. kluyveri Flavoprotein um ein dem ETF und der NADH-Dehydrogenase funktionsanaloges Protein handeln mußte.

Die zur Klassifizierung von Flavoproteinen dienende Eigenschaft der Semichinonbildung schrieb das vom orangefarbenen Flavoprotein gebildete rote Semichinonanion den Flavoprotein-Oxidasen zu (MASSEY et al., 1969). Durch die Semichinon- und Hydrochinonbildung war gleichzeitig der Hinweis zur 2-Elektronen-Übertragung erbracht. Dieses Protein könnte demnach bei eigener Reduktion $NADH_2$ oxidieren. Die beim Hydrogenase-Test festgestellte Aktivität unterstützte diese Überlegung.

Das orangefarbene Protein von C. kluyveri könnte somit, analog zum ETF von Peptostreptococcus elsdenii, folgende Reaktionen einleitend katalysieren:

(1) $NADH + H^+ + ETF_{(ox)} \longrightarrow NAD^+ + ETF_{(red)}$

(2) $ETF_{(red)} + \text{Butyryl-CoA-Dehydrogenase}_{(ox)} \longrightarrow$
$ETF_{(ox)} + \text{Butyryl-CoA-Dehydrogenase}_{(red)}$

(3) $\text{Butyryl-CoA-Dehydrogenase}_{(red)} + \text{Crotonyl-CoA} \longrightarrow$
$\text{Butyryl-CoA-Dehydrogenase}_{(ox)} + \text{Butyryl-CoA}$

(WHITFIELD und MAYHEW, 1974)

Ob der Komplex von Flavodoxin mit dem orangeroten Flavoprotein (ETF?) ein Anreicherungsartefakt oder "in-vivo-Komplex" ist und ob dieses Protein die obige Reaktionsfolge katalysieren kann, bleibt Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. C. kluyveri vermag unter Eisenmangel-Bedingungen (2,5 % der normalen Konzentration) zu wachsen. Der Gesamt-Substratumsatz und die Produktbildung waren dabei auf 80 - 85 % des Umsatzes einer regulären Kultur herabgesetzt. Der Umsatz pro Stunde gegenüber einer Normalkultur betrug 30 - 34 %. Unter Fe-Mangel sank die Zellausbeute von regulär 1 - 1,2 g Naßgewicht/l auf 0,3 - 0,4 g Naßgewicht/l.

2. Es wurde nachgewiesen, daß Molybdän keinen erkennbaren Einfluß auf den normalen und Fe-Mangel-Stoffwechsel ausübte. Zellanzuchten wurden daher, von den üblichen Nährlösungen abweichend, ohne Molybdän durchgeführt.

3. Durch Fe-Mangel induziert (0,3 - 0,1 µg Fe/ml), bildete C. kluyveri statt Ferredoxin einen funktionsanalogen eisenfreien Elektronencarrier, das Flavodoxin. Dabei war der Flavingehalt der Zellen um 12 % erhöht. Flavodoxin konnte Ferredoxin in vivo und in vitro ersetzen.

4. Flavodoxin konnte, nach den Kriterien der Disk- und Na-Dodecylsulfat-Elektrophorese, als absolut homogenes Präparat angereichert werden. Die durchschnittlichen Ausbeuten betrugen 1,8 - 1,9 mg Flavodoxin/g Trockengewicht. In 82 % Ammoniumsulfat-Lösung bildete Flavodoxin hexagonale Kristallplättchen.

   Flavodoxin bestand aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 20 100 Dalton. Als prosthetische Gruppe war FMN (Riboflavin-5'-phosphat) im molaren Verhältnis zum Apoprotein von 1 : 1 gebunden. Die molaren Extinktionskoeffizienten betrugen ε_{445} = 10 130 ($M^{-1}cm^{-1}$) und ε_{377} = 9 220 ($M^{-1}cm^{-1}$).

   FMN konnte vom Apoprotein durch Einwirkung von Na-Dodecylsulfat,

Kaliumbromid, Trichloressigsäure und Wärme abgetrennt werden. Die Temperatur, bei der ein Gleichgewicht von nativem und dissoziiertem Flavodoxin vorlag ($D_{T/2}$) betrug 56,3° C. Am nativen Flavodoxin konnten keine freien Sulfhydryl-Gruppen festgestellt werden. Die erst am FMN-freien Apoflavodoxin nachweisbare SH-Gruppe erbrachte den Hinweis, daß Cystein an der Flavin-Protein-Bindung beteiligt war. Die Aminosäurezusammensetzung des Flavodoxins ergab einen Überschuß an sauren Aminosäuren (23,4 %) und einen geringen Anteil basischer Aminosäuren (8,3 %). Den weitaus größten Teil repräsentierten hydrophobe (41,7 %) und neutrale Aminosäuren (26,6 %). Flavodoxin von C. kluyveri hatte von allen bisher beschriebenen Flavodoxinen den höchsten Gehalt an Glutaminsäure (29 Reste) und Methionin (7 Reste).

Aufgrund seiner optischen Eigenschaften und Konfiguration konnte das C. kluyveri Flavodoxin in die Klasse der "Pasteurianum"-Flavodoxine eingeordnet werden.

Flavodoxin von C. kluyveri unterlag in Gegenwart eines Elektronendonators (EDTA) der anaeroben Photoreduktion. Diese, über die blaue neutrale Semichinonstufe führende Reduktion war ebenso wie die stark ausgeprägte Autoxidationsfähigkeit pH-abhängig. Alkalischer pH stimulierte diesen Redoxvorgang.

Die Titration des Flavodoxins mit Na-Dithionit ergab eine Aufnahme von 2 Elektronen pro Molekül bis zur vollständigen Reduktion. Dabei entstand zuerst quantitativ das Semichinon.

5. Verglichen mit Ferredoxin katalysierte Flavodoxin die Carrier-abhängige Hydrogenase-Reaktion mit 80 bis 89 %iger Aktivität. Eisenmangel führte bei der Hydrogenase selbst zu 50 %igem Aktivitätsverlust. Bezogen auf ihre Aktivität verhielten sich Ferredoxin und Flavodoxin additiv, d. h. äquimolare Gemische von beiden Elektronencarriern zeigten

die gleiche Aktivität wie die Summe der Einzelaktivitäten.

6. In der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Reaktion konnte Flavodoxin das Ferredoxin zu 67 % in Gegenwart von Mercaptoäthanol und 87 % in Gegenwart von Glutathion ersetzen.

7. Die NAD(P)-Ferredoxin-Reduktasen zeigten bei Fe-Mangel einen 70 %igen Aktivitätsverlust. Flavodoxin konnte hier Ferredoxin zu 79 % bis 85 % ersetzen.

8. Die Pyruvat-Synthase wies in Fe(-)-Extrakten nur noch 1 % der Aktivität von Fe(+)-Extrakten auf. Flavodoxin katalysierte diese Reaktion mit 91 - 94 % der Aktivität äquimolaren Ferredoxins.

9. Ein orangerotes Flavoprotein wurde isoliert, dessen Chromophor aus 6-OH-FAD und 8-OH-FAD bestand. Die rote Semichinonanion-Form wies es als Flavoprotein-Oxidase aus. Dieses Protein scheint analog dem ETF von Peptostreptococcus elsdenii an der Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA beteiligt zu sein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSEN, R. D.
APGAR, P. A.
BURNETT, R. M.
DARLING, G. D.
LEQUESNE, M. E.
1972
Structure of the radical form of clostridial flavodoxin: a new molecular model.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 3189 - 3191

ANDREESEN, J. R.
LJUNGDAHL, L. G.
1973
Formate dehydrogenase of Clostridium thermoaceticum: Incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme.
J. Bacteriol. 116, 867 - 873

ANDREESEN, J. R.
EL GHAZZAWI, E.
GOTTSCHALK, G.
1974
The effect of ferrous ions, tungstate and selenite on the level of formate dehydrogenase in Clostridium formicoaceticum and formate synthesis from CO_2 during pyruvate fermentation.
Arch. Microbiol. 96, 103 - 118

ANDREW, J. G.
MORRIS, J. G.
1965
The biosynthesis of alanine by C. kluyveri.
Biochim. Biophys. Acta 97, 176 - 179

ANDREWS, P.
1964
Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex-gel-filtration.
Biochem. J. 91, 222 - 233

ANDREWS, L. J.
MACKNIGHT, M. L.
RYAN, J.
TOLLIN, G.
1973
Flavin-protein interactions in flavoenzymes. Studies of FMN binding in Azotobacter flavodoxin using protein fluorescence lifetime measurements.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 1165 - 1172

AUBEL, E.
1957
On the role of activated hydrogen in iron-deficient clostridia cultures.
Biokhimiya 22, 186 - 190

BACHOFEN, R. BUCHANAN, B. B. ARNON, D. J.	1964	Ferredoxin as a reductant in pyruvate synthesis by a bacterial extract. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 690 - 694
BALDWIN, R. L. MILLIGAN, L. P.	1964	Electron transport in Peptostreptococcus elsdenii. Biochim. Biophys. Acta 92, 421 - 432
BARKER, H. A.	1937	The production of caproic and butyric acids by the methane fermentation of ethyl alcohol. Arch. Mikrobiol. 8, 415 - 421
BARKER, H. A.	1956	Bacterial fermentations. 2. The chemistry of butyric acid - butanol fermentations. John Wiley and Sons, pp. 28 - 56
BARKER, H. A. TAHA, S. M.	1942	Clostridium kluyveri,an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. J. Bacteriol. 43, 347 - 363
BARKER, H. A.	1952	Synthesis of fatty acids by Clostridium kluyveri. The Harvey Lectures, Ser. XLV
BARMAN, B. G. TOLLIN, G.	1972	Flavine-protein interactions in flavoenzymes. Temperature-jump and stopped-flow studies of flavine analog binding to the apoprotein of Azotobacter flavodoxin. Biochemistry 11, 4746 - 4754
BARMAN, B. C. TOLLIN, G.	1972	Flavine-protein interactions in flavoenzymes. Thermodynamics and kinetics of reduction of Azotobacter flavodoxin. Biochemistry 11, 4755 - 4759
BARMAN, B. G. TOLLIN, G.	1972	Kinetics and equilibria in partially reduced flavine solutions. Biochemistry 11, 4760 - 4765

BEISENHERZ, G. BOLTZE, H. J. BÜCHLER, T. CZOK, R.	1953	Diphosphofructo-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8 b, 555 - 557
BENEMANN, J. R. YOCH, D. C. VALENTINE, R. C. ARNON, D. J.	1969	The electron transport system in nitrogen fixation by Azotobacter. I. Azotoflavin as an electron carrier. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 64, 1079 - 1086
BENEMANN, J. R. VALENTINE, R. C.	1971	High-energy electrons in Bacteria. Ed. by A. H. Rose and J. F. Wilkinson, Academic Press London New York, Vol. 5
BERGMEYER, H. U.	1970	Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr.
BERNT, E. GUTMAN, I.	1974	In Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. 3. Auflage
BOTHE, H. FALKENBERG, B.	1972	The reduction of flavodoxin from Azotobacter vinelandii by pyruvate. Z. Naturforsch. 27 b, 1090 - 1094
BORNSTEIN, B. T. BARKER, H. A.	1948	The energy metabolism of Clostridium kluyveri and the synthesis of fatty acids. J. Biol. Chem. 172, 659 - 669
BORNSTEIN, B. T. BARKER, H. A.	1948	The nutrition of Clostridium kluyveri. J. Bacteriol. 55, 223 - 230
BOTHE, H. HEMMERICH, P. SUND, H.	1971	Phytoflavin from Anacystis nidulans. In: Flavins and Flavoproteins. Ed. by H. Kamin
BOTHE, H. NOLTEERNSTING, U.	1975	Pyruvate dehydrogenase complex, pyruvate : ferredoxin oxidoreductase and lipoic acid content in microorganisms. Arch. Microbiol. 102, 53 - 57

BRADSHAW, W. H. BARKER, H. A.	1960	Purification and properties of xanthine dehydrogenase from Clostridium cylindrosporum. J. Biol. Chem. 235, 3620 - 3629
BURNETT, R. M. DARLING, G. D. KENDALL, D. S. LEQUESNE, M. E. MAYHEW, S. G. SMITH, W. W. LUDWIG, M. L.	1974	The structure of the oxidized form of clostridial flavodoxin at 1,9 Å-resolution. J. Biol. Chem. 249, 4383 - 4392
BURTON, R. M. STADTMAN, E. R.	1953	The oxidation of acetaldehyde to acetyl-coenzyme A. J. Biol. Chem. 202, 873 - 890
CAMERON, B. F.	1965	Determination of iron in heme compounds. II. Hemoglobin and myoglobin. Analyt. Biochem. 11, 164 - 169
CAMPBELL, H. D. ZERNER, B.	1973	A low-molecular weight acid phosphatase which contains iron. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1498 - 1503
CARNAHAN, J. E. MORTENSON, L. E. MOWER, H. F. CASTLE, J. E.	1960	Nitrogen fixation in cell-free extracts of Clostridium pasteurianum. Biochim. Biophys. Acta 44, 520 - 535
CHEN, J. S. MORTENSON, L. E.	1974	Purification and properties of hydrogenase from Clostridium pasteurianum W 5. Biochim. Biophys. Acta 371, 283 - 298
COLLIER, H. B.	1973	A note on the molar absorptivity of reduced Ellman's reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate. Analyt. Biochem. 56, 310 - 311
McCORMICK, D. B.	1970	The tryptophans in flavodoxin and synthetic flavinyl peptides characterized by chemical and photochemical oxidations. Experientia 26, 243 - 244

COUGHLAN, M. P. 1971 The role of iron in microbial metabolism. Sci. Prog. Oxf. 59, 1 - 23

CRESPI, H. L. 1972 Extraction and purification of ^{1}H, ^{2}H, and isotope hybrid algal cytochrome, ferredoxin and flavoprotein.
SMITH, U.
GAJDA, L.
TISUE, T.
AMMERAAL, R. M.
Biochim. Biophys. Acta 256, 611 - 618

CRESPI, H. L. 1973 ESR and NMR studies with deuterated flavodoxin.
NORRIS, J. R.
BAYS, J. P.
KATZ, J. J.
Annal. New York Acad. Sci. 222, 800 - 815

CUSANOVICH, M. A. 1971 The isolation and characterization of Rhodospirillum rubrum flavodoxin.
EDMONDSON, D. E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 327 - 336

D'ANNA, J. A. 1972 Studies of flavodoxin-protein interaction in flavoproteins using protein fluorescence and circular dichroism.
TOLLIN, G.
Biochemistry 11, 1073 - 1080

DECKER, K. 1966 Die Kohlenhydratsynthese in C. kluyveri. I. Isotopenversuche zur Biosynthese der Ribose.
THAUER, R.
JUNGERMANN, K.
Biochem. Z. 345, 461 - 471

DECKER, K. 1966 Die Kohlenhydratsynthese in C. kluyveri. II. Enzymatische Studien.
BARTH, C.
METZ, H.
Biochem. Z. 345, 472 - 492

DECKER, K. 1967 Net CO_2 fixation into the S-methyl group of methionine and into the positions 2 and 8 of the purines in Clostridium kluyveri.
JUNGERMANN, K.
THAUER, R. K.
HUNT, S. V.
Biochim. Biophys. Acta 141, 202 - 204

DECKER, K. 1970 Wege der Energiegewinnung in Anaerobiern.
JUNGERMANN, K.
THAUER, R. K.
Angew. Chemie 82, 153 - 173

DECKER, K.
PFITZER, S. 1972 Determinations of steady-state concentrations of adenine-nucleotides in growing C. kluyveri cells by biosynthetic labeling. Analyt. Biochem. 50, 529 - 539

DERVARTANIAN, D. V.
BRAMLETT, R. 1970 Electron paramagnetic resonance studies of ^{95}Mo-enriched NADH dehydrogenase isolated from iron-deficient Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta 220, 443 - 448

DETERMANN, H.
MICHEL, W. 1966 The correlation between molecular weight and elution behaviour in the gel chromatography of proteins. J. Chromatog. 25, 303 - 313

DUBOURDIEU, M.
LeGALL, J.
FOX, J. L. 1973 The amino acid sequence of Desulfovibrio vulgaris flavodoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1418 - 1425

DUBOURDIEU, M.
MACKNIGHT, M. L.
TOLLIN, G. 1974 Temperature-jump studies of Desulfovibrio vulgaris flavodoxin: Kinetics of FMN binding and of reduction of semiquinone by methyl viologen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 649 - 655

DUBOURDIEU, M.
LeGALL, J.
LETERRIER, F. 1968 Réduction photochimique et enzymatique de la flavodoxine isolée de Desulfovibrio gigas. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D. 267, 1653 - 1655

DUBOURDIEU, M.
LeGALL, J. 1970 Chemical study of two flavodoxins extracted from sulfate reducing bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 965 - 972

DUBOURDIEU, M.
LeGALL, J.
FAVAUDON, V. 1975 Physicochemical properties of flavodoxin from Desulfovibrio vulgaris. Biochim. Biophys. Acta 376, 519 - 532

EDMONDSON, D. E.
TOLLIN, G. 1971 Circular dichroism studies of the flavin chromophore and of the relation between redox properties and flavin environment in oxidases and dehydrogenases.
Biochemistry 10, 113 - 123

EDMONDSON, D. E.
TOLLIN, G. 1971 Chemical and physical characterization of the Shetna flavoprotein and apoprotein and kinetics and thermodynamics of flavin analog binding to the apoprotein.
Biochemistry 10, 124 - 132

EDMONDSON, D. E.
TOLLIN, G. 1971 Flavin-protein interactions and the redox properties of the Shetna flavoprotein.
Biochemistry 10, 133 - 145

EDMONDSON, D. E.
TOLLIN, G. 1971 Interaction in Shetna flavoprotein.
In: Flavins and Flavoproteins. Ed. by H. Kamin

EHRENBERG, A.
HEMMERICH, P. 1968 Flavocoenzymes: Chemistry and molecular biology.
In: Biological Oxidations. Ed. by T. P. Singer. John Wiley & Sons, New York, pp. 239 - 262

EHRENBERG, A.
ERIKSSON, L. E. G.
HYDE, J. S. 1971 Electron-nuclear double resonance.
In: Flavins and Flavoproteins. Ed. by H. Kamin

ELLMAN, G. L. 1959 Tissue sulfhydryl groups.
Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77

ENARI, T. M. 1958 Studies on the uptake of cobalt and iron and their effect on the production of riboflavin by Candida guilliermondii.
Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A, II, 1 - 42

ENTSCH, B.
SMILLIE, R. M.
1972
Oxidation-reduction properties of phytoflavin, a flavoprotein from blue-green algae.
Arch. Biochem. Biophys. 151, 378 - 386

FISH, W. W.
REYNOLDS, J. A.
TANFORD, C.
1970
Gel chromatography of proteins in denaturating solvents.
J. Biol. Chem. 245, 5166 - 5168

FOUST, P. G.
MAYHEW, S. G.
MASSEY, V.
1969
Complex formation between ferredoxin tri-phosphopyridine nucleotide reductase and electron transfer proteins.
J. Biol. Chem. 244, 964 - 970

FOX, J. L.
SMITH, S. S.
BROWN, J. R.
1972
Amino acid sequences of Clostridium pasteurianum flavodoxin.
Z. Naturforsch. 27 b, 1096 - 1100

FOX, J. L.
1974
Sodium dithionite reduction of flavin.
FEBS Letters 39, 53 - 55

FREDRICKS, W. W.
STADTMAN, E. R.
1965
The nature of the cofactor requirements of the hydrogenase system from Clostridium kluyveri.
J. Biol. Chem. 240, 4809 - 4815

FREDRICKS, W. W.
STADTMAN, E. R.
1965
The role of ferredoxin in the hydrogenase system from Clostridium kluyveri.
J. Biol. Chem. 240, 4065 - 4071

FRITZ, J.
MÜLLER, F.
MAYHEW, S. G.
1973
Electron-nuclear double resonance study of flavodoxin from Peptostreptococcus elsdenii.
Helv. Chim. Acta 56, 2250 - 2254

LeGALL, J.
HATCHIKIAN, E. C.
1967
Purification et propriétés d'une flavoprotéine intervenant dans la réduction du sulfite par Desulfovibrio gigas.
C. R. Acad. Sci. Paris, 2580 D 264

GEST, H. GIBBS, M.	1952	Preparation and properties of cell-free "formic hydrogenlyase" from Escherichia coli. J. Bacteriol. 63, 661 - 664
GHISLA, S. MAYHEW, S. G.	1973	Identification and structure of a novel flavin prosthetic group associated with reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase from Peptostreptococcus elsdenii. J. Biol. Chem. 248, 6568 - 6570
GILLARD, J. M. TOLLIN, G.	1974	Effect of complexation of flavin radical with tryptophan on electron transfer rates: A model for flavin-protein-interactions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 328
GHISLA, S. MASSEY, V. LHOSTE, J. M. MAYHEW, S. G.	1974	Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins. Biochemistry 13, 589 - 597
GOTTSCHALK, G. CHOWDHURY, A. A.	1969	Pyruvate synthesis from acetyl-CoA and CO_2 with $NADH_2$ or $NADPH_2$ as electron donors. FEBS Letters 2, 342 - 344
GRAY, C. T. GEST, H.	1965	Biological formation of molecular hydrogen. Science 148, 186 - 192
GUARRAIA, L. J. LAISHLEY, E. J. FORGET, N. PECK, H. D.	1968	The role of ferredoxin and flavodoxin in the sulfur metabolism of Desulfovibrio gigas. Bact. Proceedings, p. 129
HANSON, A. M. RODGERS, N. E.	1946	Influence of iron concentration and attenuation on the metabolism of Clostridium acetobutylicum. J. Bacteriol. 51, 568 - 569
HARBURY, H. A. LaNOUE, K. F. LOACH, P. A. AMICK, R. M.	1959	Molecular interaction of isoalloxazine derivatives. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 45, 1708 - 1717

HARRISON, P. M.
HOFMANN, T. 1961 On the determination of tryptophan in proteins.
Biochem. J. 80, 38 P

HATCHIKIAN, E. C.
LeGALL, J. 1970 Etude du métabolisme des acides dicarboxyliques et du pyruvate chez les bactéries sulfato-réductrices (I).
Ann. Inst. Pasteur 118, 125 - 142

HATCHIKIAN, E. C.
LeGALL, J. 1970 Etude du métabolisme des acides dicarboxyliques et du pyruvate chez les bactéries sulfato-réductries (II).
Ann. Inst. Pasteur 118, 288 - 301

HATCHIKIAN, E. C.
LeGALL, J. 1972 Regulation of the reduction of sulfite and thiosulfate by ferredoxin, flavodoxin and cytochrome cc'3 in extracts of the sulfate reducer Desulfovibrio gigas.
Biochim. Biophys. Acta 258, 701 - 708

HEMMERICH, P.
VEEGER, C.
WOOD, H. C. S. 1965 Fortschritte in Chemie und Molekularbiologie der Flavine und Flavocoenzyme.
Angew. Chemie 77, 699 - 716

HEMMERICH, P.
NAGELSCHNEIDER, G.
VEEGER, C. 1970 Chemistry and molecular biology of flavins and flavoproteins.
FEBS Letters 8, 69 - 83

HICKEY, R. J. 1945 The inactivation of iron by 2, 2'-bipyridine and its effect on riboflavin synthesis by Clostridium acetobutylicum. Arch. Biochem. Biophys. 8, 439

HILLMER, P.
GOTTSCHALK, G. 1972 Particulate nature of enzymes involved in the fermentation of ethanol and acetate by Clostridium kluyveri.
FEBS Letters 21, 351 - 354

HINKSON, J. W. 1968 Azotobacter free-radical flavoprotein. Preparation and properties of the apoprotein.
Biochemistry 7, 2666 - 2672

HINKSON, J. W.
BULEN, W. A. 1967 A free radical flavoprotein from Azotobacter (isolation, crystallization and properties).
J. Biol. Chem. 242, 3345 - 3351

HOLDEMAN, L. V.
MOORE, W. E. C. 1972 Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA

HOLZ, G.
BERGMEYER, H. U. 1974 In: Bergmeyer, H. U: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage

HUGO, H. von
SCHOBERTH, S.
MADAN, V. K.
GOTTSCHALK, G. 1972 Coenzyme specifity of dehydrogenases and fermentation of pyruvate by clostridia.
Arch. Mikrobiol. 87, 189 - 202

IRIE, K.
KOBAYASHI, K.
KOBAYASHI, M.
ISHIMOTO, M. 1973 Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria. XII. Some properties of flavodoxin from Desulfovibrio vulgaris.
J. Biochem. 73, 353 - 366

JOHNSTONE, D. B.
FISHBEIN, J. R. 1956 Identification of Azotobacter species by fluorescence and cell analysis.
J. Gen. Microbiol. 14, 330 - 335

JUNGERMANN, K.
THAUER, R. K.
DECKER, K. 1968 The synthesis of one-carbon units from CO_2 in Clostridium kluyveri.
Eur. J. Biochem. 3, 351 - 359

JUNGERMANN, K.
THAUER, R. K.
WENNING, J.
DECKER, K. 1968 Confirmation of unusual stereochemistry of glutamate biosynthesis in Clostridium kluyveri.
FEBS Letters 1, 74 - 76

JUNGERMANN, K.
THAUER, R. K.
RUPPRECHT, E.
OHRLOFF, C.
DECKER, K. 1969 Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of Clostridium kluyveri.
FEBS Letters 3, 144 - 146

JUNGERMANN, K.
KIRCHNIAWY, H.
THAUER, R. K. 1970 Ferredoxin dependent CO_2 reduction to formate in Clostridium pasteurianum.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 682 - 689

JUNGERMANN, K. A.
SCHMIDT, W.
KIRCHNIAWY, F. H.
RUPPRECHT, E. H.
THAUER, R. K.
1970
Glycine formation via threonine and serine aldolase in Clostridium kluyveri.
Eur. J. Biochem. 16, 424 - 429

JUNGERMANN, K.
RUPPRECHT, E.
OHRLOFF, C.
THAUER, R.
DECKER, K.
1971
Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in Clostridium kluyveri.
J. Biol. Chem. 246, 960 - 963

JUNGERMANN, K.
THAUER, R. K.
LEIMENSTOLL, G.
DECKER, K.
1973
Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia.
Biochim. Biophys. Acta 305, 268 - 280

KAMIN, H.
1971
Flavins and Flavoproteins.
3rd International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Durham, North Carolina, University Park Press, Baltimore

KILGOUR, G. L.
FELTON, S. P.
HUENNEKENS, F. M.
1957
Paper chromatography of flavins and flavin nucleotides.
J. Amer. Chem. Soc. 79, 2254 - 2256

KINSKY, S. C.
1959
Hydrogen oxidation by Clostridium kluyveri.
J. Biol. Chem. 234, 973 - 978

KINSKY, S. C.
STADTMAN, E. R.
MACLAY, H. K.
1961
Cofactor requirements for pyridine nucleotide reduction by hydrogen.
J. Biol. Chem. 236, 574 - 579

KNIGHT, E. Jr.
D'EUSTACHIO, A. J.
HARDY, R. W. F.
1966
Flavodoxin: a flavoprotein with ferredoxin activity from Clostridium pasteurianum.
Biochim. Biophys. Acta 113, 626 - 628

KNIGHT, E. Jr.
HARDY, R. W. F.
1966
Isolation and characteristics of flavodoxin from nitrogen-fixing Clostridium pasteurianum.
J. Biol. Chem. 241, 2752 - 2756

KNIGHT, E. Jr.
HARDY, R. W. F.
1967
Flavodoxin. Chemical and biological properties.
J. Biol. Chem. 242, 1370 - 1374

KNIGHT, E.
HARDY, R. W. F.
1971
Flavodoxin of Clostridium pasteurianum.
Methods in Enzym. Colowick-Kaplan, Vol. XVIII, Part 3, 592 - 598

MACKNIGHT, M. L.
GILLARD, J. M.
TOLLIN, G.
1973
Flavine-protein interactions in flavoenzymes. pH Dependence of the binding of FMN and riboflavine to Azotobacter flavodoxin.
Biochemistry 12, 4200 - 4206

MACKNIGHT, M. L.
GRAY, W. R.
TOLLIN, G.
1974
N-Terminal amino acid sequences of Azotobacter vinelandii and Rhodospirillum rubrum flavodoxins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 630 - 637

KOENIG, R.
STEGEMANN, H.
FRANCKSEN, H.
PAUL, H. L.
1970
Protein subunits in the potato virus x group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 207, 184 - 189

KORKES, S.
1955
Enzymatic reduction of pyridine nucleotides by molecular hydrogen.
J. Biol. Chem. 216, 737 - 748

LIN, B. van
BOTHE, H.
1972
Flavodoxin from Azotobacter vinelandii.
Arch. Mikrobiol. 82, 155 - 172

LIPMANN, F.
TUTTLE, L. C.
1945
A specific micromethod for the determination of acyl phosphates.
J. Biol. Chem. 159, 21 - 28

LOVENBERG, W.
BUCHANAN, B. B.
RABINOWITZ, J. C.
1963
Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin.
J. Biol. Chem. 238, 3899 - 3913

LOVENBERG, W.
1973
Iron-sulfur proteins. Vol. I. Molecular Biology, Academic Press, New York

LOVENBERG, W.	1973	Iron-sulfur proteins, Vol. II. Molecular Biology, Academic Press, New York
LUDWIG, M. L. ANDERSEN, R. D. MAYHEW, S. G. MASSEY, V.	1969	The structure of a clostridial flavodoxin. J. Biol. Chem. 244, 6047 - 6048
LUDWIG, M. L. ANDERSEN, R. APGAR, P. A. LEQUESNE, M.	1971	A preliminary crystallographic study of clostridial flavodoxin. In: Flavins and Flavoproteins. Ed. by H. Kamin
MALKIN, R. RABINOWITZ, J. C.	1967	Nonheme iron electron-transfer proteins. Ann. Rev. Biochem. 36, 113 - 148
MASON, R. ZUBIETA, J. A.	1973	Eisen-Schwefel-Proteine. Angew. Chemie 9, 390 - 400
MASSEY, V. PALMER, G.	1966	On the existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. A new method for the quantitative production of flavoprotein semiquinones. Biochemistry 5, 3181 - 3189
MASSEY, V. MÜLLER, F. FELDBERG, R. SCHUMAN, M. SULLIVAN, P. A. HOWELL, L. G. MAYHEW, S. G. MATTHEWS, R. G. FOUST, G. P.	1969	The reactivity of flavoproteins with sulfite. J. Biol. Chem. 244, 3999 - 4006
MASSEY, V. MATTHEWS, R. G. FOUST, G. P. HOWELL, L. G. WILLIAMS, C. H. Jr. ZANETTI, G. RONCHI, S.	1970	A new intermediate in TPNH-linked flavoproteins. In: Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases, Proceedings 1969. Ed. by Sund, H., Springer Verlag

MASSEY, V.
GHISLA, S.
1973
Role of charge-transfer interactions in flavoprotein catalysis.
Ann. New York Acad. Aci. 227, 446 - 465

MAURER, H. R.
1968
Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Walter de Gruyter & Co., Berlin

MAYHEW, S. G.
FOUST, G. P.
MASSEY, V.
1969
Oxidation-reduction properties of flavodoxin from Peptostreptococcus elsdenii.
J. Biol. Chem. 244, 803 - 810

MAYHEW, S. G.
MASSEY, V.
1969
Purification and characterization of flavodoxin from Peptostreptococcus elsdenii.
J. Biol. Chem. 244, 794 - 802

MAYHEW, S. G.
1971
Properties of two clostridial flavodoxins.
Biochim. Biophys. Acta 235, 276 - 288

MAYHEW, S. G.
1971
Studies on flavin binding in flavodoxins.
Biochim. Biophys. Acta 235, 289 - 302

MAYHEW, S. G.
1971
Studies in the binding of FMN and other flavin compounds to apoflavodoxin.
In: Flavins and Flavoproteins. Ed. by H. Kamin

MAYHEW, S. G.
MASSEY, V.
1971
Evidence for a novel flavin prosthetic group associated with NADH dehydrogenase from Peptostreptococcus elsdenii.
Biochim. Biophys. Acta 235, 303 - 310

MAYHEW, S. G.
MASSEY, V.
1973
Studies on the kinetics and mechanism of reduction of flavodoxin from Peptostreptococcus elsdenii by sodium dithionite.
Biochim. Biophys. Acta 315, 181 - 190

MAYHEW, S. G.
WHITFIELD, C. D.
GISHLA, S.
SCHUMANN-JÖRNS, M.
1974
Identification and properties of new flavins in electron-transfering flavoprotein from Peptostreptococcus elsdenii and pig-liver glycolate oxidase.
Eur. J. Biochem. 44, 579 - 602

MEYER, F. R.
RONGE, G.
1939
Entfernen von Sauerstoff aus Gasen mittels aktiven Kupfers.
Angew. Chemie 52, 637 - 638

MORTENSON, L. E.
VALENTINE, R. C.
CARNAHAN, J. E.
1963
Ferredoxin in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in Clostridium pasteurianum.
J. Biol. Chem. 238, 794 - 800

MORTENSON, L. E.
1964
Purification and analysis of ferredoxin from Clostridium pasteurianum.
Biochim. Biophys. Acta 81, 71 - 77

MORTENSON, L. E.
MORRIS, J. A.
JENG, D. Y.
1967
Purification, metal composition and properties of molybdo-ferredoxin and azoferredoxin, two of the components of the nitrogen-fixing system of Clostridium pasteurianum.
Biochim. Biophys. Acta 141, 516 - 522

MORTENSON, L. E.
CHEN, J. S.
1974
Microbial Iron Metabolism. Ed. by Neilands, J. B., Academic Press, New York, pp. 231 - 282

MÜLLER, F.
MAYHEW, S. G.
MASSEY, V.
1973
On the effect of temperature on the absorption spectra of free and protein-bound flavines.
Biochemistry 12, 4654 - 4662

NEIMS, A. H.
HELLERMAN, L.
1970
Flavoenzyme catalysis.
Ann. Rev. Biochem. 39, 867 - 888

NICHOLAS, D. J. D.
1958
Some effects of trace metals on hydrogenase activity and nitrogen fixation in Azotobacter spp. and in Clostridium pasteurianum.
J. Appl. Bacteriol. 21

NICHOLAS, D. J. D.
NASON, A.
McELROY, W. D.
1954
Molybdenum and nitrate reductase. I. Effect of molybdenum deficiency on the Neurospora enzyme. J. Biol. Chem. 207, 341 - 351

NICHOLAS, D. J. D.
NASON, A.
1954
Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of the nitrate reductase. J. Biol. Chem. 207, 353 - 360

NICHOLAS, D. J. D.
FISHER, D. J.
REDMOND, W. J.
WRIGHT, M. A.
1960
Some aspects of hydrogenase activity and nitrogen fixation in Azotobacter spp. and in Clostridium pasteurianum. J. Gen. Microbiol. 22, 191 - 205

PALMER, G.
MASSEY, V.
1968
Mechanisms of flavoprotein catalysis. In: Biological oxidations. Ed. by Singer, T. P., John Wiley & Sons, New York, pp. 263 - 300

PAPPENHEIMER, A. M.
SHASKAN, E.
1944
Effect of iron on carbohydrate metabolism of Clostridium welchii. J. Biol. Chem. 155, 265 - 275

PECK, H. D.
GEST, H.
1957
Hydrogenase of Clostridium butylicum. J. Bacteriol. 73, 569 - 580

PEEL, J. L.
1958
The separation of flavin by paper electrophoresis and its application to the examination of the flavin contents of micro-organisms. Biochem. J. 69, 403 - 416

RAEBURN, S.
RABINOWITZ, J. C.
Pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase from Clostridium acidi-urici. In: Non-heme iron proteins: role in energy conversion. Ed by A. San Pietro, The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, pp. 189 - 197

RAGAN, C. J.
GARLAND, P. B.
1971
Spectroscopic studies of flavoproteins and non-haem iron proteins of submitochondrial particles of Torulopsis utilis modified ny iron- and sulphate-limited growth in continuous culture. Biochem. J. 124, 171 - 187

LaRIVIERE, J. W. M.	1958	On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers. Dissertation, Universität Delft
RODGERS, N. E. HENIKA, R. U. HANSON, A. M.	1946	Relation of strain variation and culture history to the synthesis of riboflavin by Clostridium acetobutylicum. J. Bacteriol. 51, 569 - 570
RYAN, J. TOLLIN, G.	1973	Flavine-protein interactions in flavoenzymes. Effect of chemical modification of tryptophan residues upon flavine mononucleotide binding and protein fluorescence in Azotobacter flavodoxin. Biochemistry 12, 4550 - 4554
SAN PIETRO, A.	1965	Non-heme iron proteins. The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio
SHAPIRO, A. L. VINUELA, E. MAIZEL, J. V. Jr.	1967	Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 - 820
SHETNA, Y. J.	1970	Non-heme iron (iron-sulfur) proteins of Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta 205, 58 - 62
SHIGA, K. TOLLIN, G.	1974	Flavine-protein interactions in flavoenzymes. Effects of aggregation of the apoprotein of Azotobacter flavodoxin on coenzyme binding. Biochemistry 13, 3268 - 3272
SHUSTER, C. W. GUNSALUS, I. C.	1958	Energy coupled electron transport in Clostridium kluyveri. Fed. Proc. 17, 310
SINGER, T. P.	1968	Biological oxidations. Interscience Publishers, John Wiley & Sons, New York

SMILLIE, R. M.	1965	Isolation of two proteins with chloroplast ferredoxin activity from a blue-green alga. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 621 - 629
SMITH, S. T. RAJAGOPALAN, K. V. HANDLER, P.	1967	Purification and properties of xanthin dehydrogenase from Micrococcus lactilyticus. J. Biol. Chem. 242, 4108 - 4117
SPIES, J. R. CHAMBERS, D. C.	1949	Chemical determination of tryptophan in proteins. Analyt. Chemistry 21, 1249 - 1266
SCHACTERLE, G. R. POLLACK, R. L.	1973	A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. Analyt. Biochem. 51, 654 - 655
SCHMIDT, K. LIAAEN-JENSEN, S. SCHLEGEL, H. G.	1963	Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty. Arch. Mikrobiol. 46, 117 - 126
SCHOBERTH, S. GOTTSCHALK, G.	1969	Considerations on the energy metabolism of Clostridium kluyveri. Arch. Mikrobiol. 65, 318 - 328
SCHOBERTH, S.	1970	Untersuchungen über die Äthanol-Acetat-Gärung von Clostridium kluyveri. Dissertation Göttingen
SCHWAN, T. V.	1971	Physiologische Untersuchungen an Clostridium kluyveri unter Eisenmangel-Bedingungen. Diplomarbeit Göttingen
STADTMAN, E. R. BARKER, H. A.	1949 b	II. The aerobic oxidation of ethanol and butyrate with the formation of acetyl phosphate. J. Biol. Chem. 180, 1095 - 1115

STADTMAN, E. R. BARKER, H. A.	1949 c	III. The activation of molecular hydrogen and the conversion of acetyl phosphate and acetate to butyrate. J. Biol. Chem. 180, 1117 - 1124
STADTMAN, E. R. BURTON, R. M.	1955	Aldehyde dehydrogenase from Clostridium kluyveri. In: Methods in Enzymology. Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 518 - 523
STADTMAN, E. R.	1966	Some considerations of the energy metabolism of anaerobic bacteria. In: Current aspects of biochemical energetics. Ed. by N. O. Kaplan and E. P. Kennedy. Academic Press, New York and London, pp. 39 - 61
STEGEMANN, H.	1972	Apparatur zur thermokonstanten Elektrophorese oder Fokussierung und ihre Zusatzteile. Z. Anal. Chem. 261, 388 - 391
STERN, I. R.		Role of cofactors in pyruvate oxidation and synthesis by extracts of Clostridium kluyveri. In: Non-heme iron proteins: role in energy conversion. Ed. by A. San Pietro, pp. 199 - 209
STOUTHAMER, A. H.	1969	Determination and significance of molar growth yields. In: Methods in microbiology, Vol. 1. Ed. by J. R. Norris and D. W. Ribbons, Academic Press, London and New York, pp. 629 - 663
TANAKA, M. HANIU, M. MATSUEDA, G. YASUNOBU, K. MAYHEW, S.	1971	Amino- and carboxyl-terminal amino acid sequences of the Peptostreptococcus elsdenii and Clostridium pasteurianum flavodoxins. Biochemistry 10, 3041 - 3046
TANAKA, M. HANIU, M. YASUNOBU, K. T.	1973	The primary structure of Peptostreptococcus elsdenii flavodoxin. J. Biol. Chem. 248, 4354 - 4366

TEMPERLI, A. 1960 Some properties of a soluble and particle-bound hydrogenase in Aerobacter aerogenes.
PENGRA, R. M.
WILSON, P. W.
Biochim. Biophys. Acta 38, 557 - 558

THAUER, R. K. 1967 A quantitative isotope method for regulation studies of aromatic amino acid synthesis under growth conditions.
JUNGERMANN, K.
DECKER, K.
Eur. J. Biochem. 1, 482 - 486

THAUER, R. K. 1968 The energy metabolism of Clostridium kluyveri.
JUNGERMANN, K.
HENNINGER, H.
WENNING, J.
DECKER, K.
Eur. J. Biochem. 4, 173 - 180

THAUER, R. K. 1969 Hydrogen formation from NADH in cell-free extracts of Clostridium kluyveri. Acetyl-CoA requirement and ferredoxin dependence.
JUNGERMANN, K.
RUPPRECHT, E.
DECKER, K.
FEBS Letters 4, 108 - 112

THAUER, R. K. 1970 Glyoxylate inhibition of clostridial pyruvate synthase.
RUPPRECHT, E.
JUNGERMANN, K.
FEBS Letters 9, 271 - 273

THAUER, R. K. 1970 The synthesis of one-carbon units from CO_2 via a new ferredoxin dependent monocarboxylic acid cycle.
RUPPRECHT, E.
JUNGERMANN, K.
FEBS Letters 8, 304 - 307

THAUER, R. K. 1971 Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-ferredoxin reductase system in Clostridium kluyveri.
RUPPRECHT, E.
OHRLOFF, C.
JUNGERMANN, K.
DECKER, K.
J. Biol. Chem. 246, 954 - 959

THAUER, R. K. 1972 Properties and function of the pyruvate-formate-lyase reaction in clostridiae.
KIRCHNIAWY, F. H.
JUNGERMANN, K. A.
Eur. J. Biochem. 27, 282 - 290

THAUER, R. K. 1973 CO_2 reductase from Clostridium pasteurianum : molybdenum dependence of synthesis and inactivation by cyanide.
FUCHS, G.
SCHNITKER, U.
JUNGERMANN, K.
FEBS Letters 38, 45 - 48

TOLLIN, G.	1971	In: Flavins and Flavoproteins. Ed. by Kamin, H., University Park Press, Baltimore, pp. 234 - 237
TOMLINSON, N. BARKER, H. A.	1954 a	Carbon dioxide and acetate utilization by Clostridium kluyveri. I. Influence of nutritional conditions on utilization patterns. J. Biol. Chem. 209, 585 - 595
TOMLINSON, N. BARKER, H. A.	1954 b	Carbon dioxide and acetate utilization by Clostridium kluyveri. III. A new path of glutamic acid synthesis. J. Biol. Chem. 209, 605 - 609
UDENFRIEND, S.	1962	Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Vol. II. Molecular Biology, Academic Press, New York
UMBREIT, W. BURRIS, R. STAUFFER, J.	1964	Manometric techniques. Minneapolis, Minn. Burgess Publ. Co.
VALENTINE, R. C. WOLFE, R. S.	1963	Role of ferredoxin in the metabolism of molecular hydrogen. J. Bacteriol. 85, 1114 - 1120
VETTER, H. KNAPPE, J.	1971	Flavodoxin and ferredoxin of Escherichia coli. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 433 - 446
WARING, W. S. WERKMAN, C. H.	1943	Growth of bacteria in an iron-free medium. Arch. Biochem. 1, 303 - 310
WARING, W. S. WERKMAN, C. H.	1943	Iron requirements of heterotrophic bacteria. Arch. Biochem. 1, 425 - 433
WATENPAUGH, K. D. SIEKER, L. C. JENSEN, L. H. LeGALL, J. DUBOURDIEU, M.	1972	Flavodoxin from the sulfate reducing bacterium Desulfovibrio vulgaris. Its structure at 2,5 Å resolution. Z. Naturforsch. 27 b, 1094 - 1095

WATENPAUGH, K. D.
SIEKER, L. C.
JENSEN, L. H.
LeGALL, J.
DUBOURDIEU, M.
1972
Structure of the oxidized form of a flavodoxin at 2,5-Å resolution.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 3185 - 3188

WEBER, K.
OSBORN, M.
1969
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412

WEBER, K.
PRINGLE, J. R.
OSBORN, M.
1972
Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels.
In: Methods in Enzymology. Ed. by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Vol. XXVI, 3 - 27

WHITBY, L. G.
1953
A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide.
Biochem. J. 54, 437 - 442

WHITFIELD, C. D.
MAYHEW, S. G.
1974
Purification and properties of electron-transferring flavoprotein from Peptostreptococcus elsdenii.
J. Biol. Chem. 249, 2801 - 2810

WHITFIELD, C. D.
MAYHEW, S. G.
1974
Evidence that apo-reduced NADH-dehydrogenase and apo-electron-transferring flavoprotein from Peptostreptococcus elsdenii are identical.
J. Biol. Chem. 249, 2811 - 2815

YAGI, K.
1962
Chemical determination of flavins.
In: Methods of biochemical analysis, Vol. 10. Ed. by Glick, D. John Wiley & Sons, New York, pp. 319 - 356

YAGI, K.
1968
Flavins and flavoproteins. 2nd Conference on Flavins and Flavoproteins.
University of Tokyo Press

YATES, M. G.
1972
Electron transport to nitrogenase in Azotobacter chroococcum: Azotobacter flavodoxin hydroquinone as an electron donor.
FEBS Letters 27, 63 - 67

YOCH, D. C.
VALENTINE, R. C. 1972 Ferredoxins and flavodoxins of bacteria.
Ann. Rev. Microbiol. 26, 139 - 162

YOCH, D. C. 1974 Electron transport carriers involved in nitrogen fixation by the coliform, Klebsiella pneumoniae.
J. Gen. Microbiol. 83, 153 - 164

ZUMFT, W. G.
SPILLER, H. 1971 Characterization of a flavodoxin from the green alga Chlorella.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 112 - 118

Abkürzungen

Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
C.	Clostridium
CD	Zirkular Dichroismus
CoA	Coenzym A
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DTNB	5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoat
DH	Dehydrogenase
DNase	Desoxyribonuclease
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ETF	Elektronentransport-Flavoprotein
Fd	Ferredoxin
Fld	Flavodoxin
FMN	Riboflavin-5'-phosphat
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
KPO_4	Gemisch von KH_2PO_4 und K_2HPO_4
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MET	2-Mercaptoäthanol
MG	Molekulargewicht
NAD(P)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-(phosphat)
Per	Ammoniumperoxydisulfat
RF	Riboflavin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Enzymeinheit
upm	Umdrehung pro Minute

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für sein reges Interesse an ihrem Fortgang und für die mir stets gewährte Unterstützung.

Ich danke Herrn Dr. R. Brinkmann und Herrn H. Müller für ihre Hilfe bei der Anzucht der Massenkulturen. Herrn Dipl. Geol. H. Scholz danke ich für die Stereoscan-Aufnahmen der Flavodoxin-Kristalle.

Lebenslauf

Ich wurde am 10. Juni 1943 in Pilsen (CSSR) geboren. In Felsberg (Hessen) besuchte ich die Grundschule und legte im Frühjahr 1964 am Gymnasium Melsungen die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr trat ich in die Bundeswehr ein und wurde 1966 als Leutnant entlassen. Anschließend studierte ich in Marburg und Gießen Biologie und begann 1969 in Göttingen das Studium der Mikrobiologie. Im Oktober 1971 legte ich die Diplom-Hauptprüfung für Biologie mit Mikrobiologie als Hauptfach und Chemie und Biochemie als Nebenfächer ab. Die anschließend im Institut für Mikrobiologie angefertigte Diplomarbeit hatte das Thema: "Physiologische Untersuchungen an Clostridium kluyveri unter Eisenmangel-Bedingungen". Seit September 1972 arbeite ich im Institut für Mikrobiologie an der vorliegenden Dissertation.